

## METHODS FOR IN VIVO DELIVERY OF BIOLOGICS AND COMPOSITIONS USEFUL THEREFOR

**Publication number:** JP8507075 (T)

**Publication date:** 1996-07-30

**Inventor(s):**

**Applicant(s):**

**Classification:**

**- international:**

A23L1/29; A61K47/30; A61K47/48; A61K49/00;  
A61K49/04; A61K49/18; A61K49/22; A61K51/00;  
A61K9/00; A61K9/50; A61K9/51; A23L1/29; A61K47/30;  
A61K47/48; A61K49/00; A61K49/04; A61K49/06;  
A61K49/22; A61K51/00; A61K9/00; A61K9/50; A61K9/51;  
(IPC1-7): A61K47/48; A61K49/00; A61K49/04; A61K51/00;  
A61K9/50

**- European:**

A23L1/29F; A61K47/48W8; A61K47/48W8D; A61K49/18;  
A61K49/18P; A61K49/18P8; A61K49/22P; A61K49/22P12;  
A61K49/22P4; A61K9/00M5F; A61K9/50H6H;  
A61K9/51H6B; A61K9/51H6D; A61K9/51H6F;  
A61K9/51H6H; Y01N2/00

**Application number:** JP19940519260T 19940222

**Priority number(s):** US19930023698 19930222; US19930035150 19930326;  
WO1994US01985 19940222

**Also published as:**

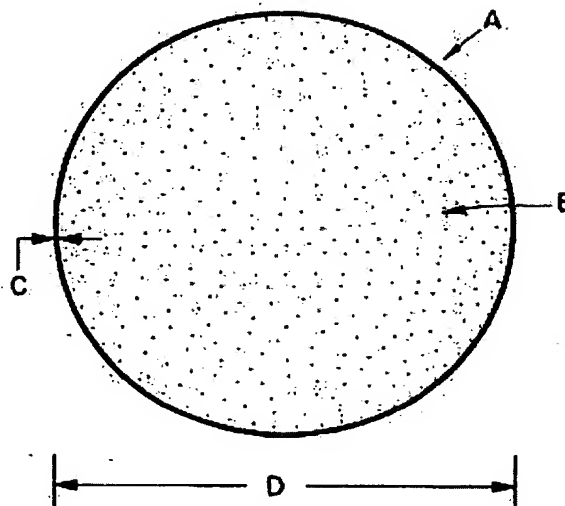
JP3746293 (B2)  
WO9418954 (A1)  
US5498421 (A)  
US2009048331 (A1)  
PT693924 (E)

more >>

Abstract not available for JP 8507075 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9418954 (A1)**

In accordance with the present invention, there are provided compositions useful for the in vivo delivery of a biologic, wherein the biologic is associated with a polymeric shell formulated from a biocompatible material. The biologic can be associated with the polymeric shell itself, and/or the biologic, optionally suspended/dispersed in a biocompatible dispersing agent, can be encased by the polymeric shell. In another aspect, the biologic associated with polymeric shell is administered to a subject, optionally dispersed in a suitable biocompatible liquid.



(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-507075

(43)公表日 平成8年(1996)7月30日

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 9/50		A 9455-4C	
47/48		B 7433-4C	
49/00		C 7431-4C	
49/04		A 7431-4C	
		7431-4C	
		A 6 1 K 49/02	A
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 91 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-519260  
 (86)(22)出願日 平成6年(1994)2月22日  
 (85)翻訳文提出日 平成7年(1995)8月21日  
 (86)国際出願番号 PCT/US94/01985  
 (87)国際公開番号 WO94/18954  
 (87)国際公開日 平成6年(1994)9月1日  
 (31)優先権主張番号 08/023,698  
 (32)優先日 1993年2月22日  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 08/035,150  
 (32)優先日 1993年3月26日  
 (33)優先権主張国 米国(US)

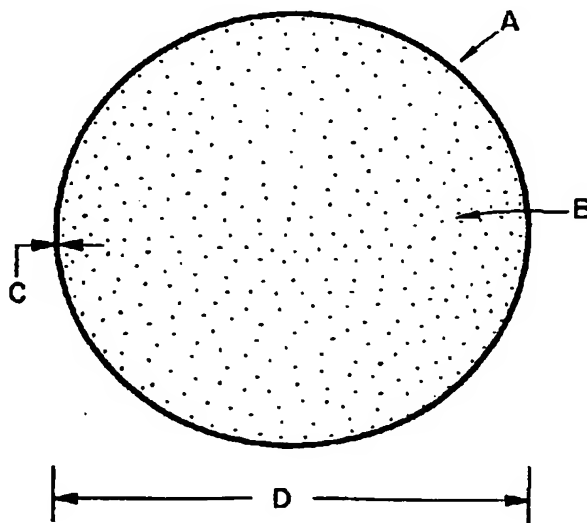
(71)出願人 ビーボウアールエックス ファーマスーティカルズ, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国90404 カリフォルニア州, サンタモニカ, セカンド フロア, ネブラスカ アベニュー 3212  
 (72)発明者 グリンスタッフ, マーク, ダブリュ.  
 アメリカ合衆国91106 カリフォルニア州, パサデナ, サウス メンター 330, ナンバー 231  
 (74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生物製剤のインビボ送達の方法とそのための組成物

## (57)【要約】

本発明において、生体適合性物質より調製される高分子殻に結合している生物製剤の、インビボ送達に有用な組成物が与えられる。生物製剤は高分子殻自身に結合しており、および/または、生物製剤は随時生体適合性分散剤中に懸濁/分散されて、高分子殻に閉じこめられている。別の面で、高分子殻に結合した生物製剤は、随時適切な生体適合性液体中に分散されて、対象者に投与される。



(2)

特表平8-507075

## 【特許請求の範囲】

1. 生物製剤 (biologic) のインビボ送達のための組成物であって、生物製剤は、

生体適合性分散剤中に随時分散され、高分子殻 (polymeric shell) 内に実質的に完全に封じ込められた固体、

生体適合性分散剤中に随時分散され、高分子殻内に実質的に完全に封じ込められた液体、

生体適合性分散剤中に随時分散され、高分子殻内に実質的に完全に封じ込められた気体、

高分子殻に関連した気体、またはそれらの任意の2つ以上の混合物よりなる群から選択され、

殻の最大の断面の大きさは約10ミクロン以下であり、

高分子殻は、実質的にジスルフィド結合により架橋した生体適合性物質よりなり、高分子殻の外部は、随時共有結合により高分子殻に結合した適切な物質により随時修飾されている、上記組成物。

2. 固体、液体または気体が結合している高分子殻は、血液代替物としての使用に適した、請求項1に記載の組成物。

3. 生物製剤は、薬理活性物質、診断薬、または栄養価のある物質より選択される、請求項1に記載の組成物。

4. 請求項3に記載の組成物であって、薬理活性物質は、鎮痛薬、麻酔薬、抗喘息薬、抗生物質、抗うつ剤、抗糖尿病薬、抗真菌剤、抗高血圧剤、抗炎症薬、抗新生物剤、不安緩解剤、酵素活性剤、核酸作成体、免疫刺激剤、免疫抑制剤、薬理活性ガスまたはワクチンより選択される、上記組成物。

5. 薬理活性物質は核酸作成体である、請求項4に記載の組成物。

6. 診断薬は、超音波造影剤、放射性造影剤、または磁気造影剤より選択される、請求項3に記載の組成物。

7. 磁気造影剤は、フッ素含有磁気共鳴画像診断剤である、請求項6に記載の組成物。

(3)

特表平8-507075

8. 請求項7に記載の組成物であって、フッ素含有磁気共鳴画像診断剤は、

(a)  $C_x F_{2x+y-z} A_z$ 、式中、

$x = 1 \sim 30$ 、好ましくは5～15であり、

$y = 2$ ；または  $x \geq 2$  の時、0または-2；または  $x \geq 4$  の時、-4であり、

$z = 0$  から  $(2x + y - 1)$  までの任意の整数であり、そして

Aは、H、F以外のハロゲン、-CN、-OR（ここで、RはH、アルキル、フルオロアルキル、アルケニル、フルオロアルケニル、アルキニル、フルオロアルキニル、アリール、フルオロアリール、アルカノイル、フルオロアルカノイル、アルケノイル、フルオロアルケノイル、アルキノイル、フルオロアルキノイルである）から選択される、

(b)  $[C_x F_{2x+y'-z} A_z]_a J R_{b-a}$ 、式中、

x、z、AおよびRは上記と同義であり、

$y' = +1$ ；または  $x \geq 2$  の時、-1または-3；または  $x \geq 4$  の時、-5であり、

J = O、S、N、P、AlまたはSiであり、

a = 1、2、3または4であり、そして

b = 2（2価のJの場合）であるか、または

3（3価のJの場合）、

4（4価のJの場合）であり、

(c)  $A' - [(CF_2)_x - O]_c - A''$ 、式中、

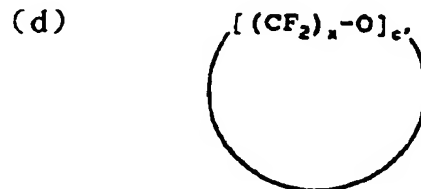
xは上記と同義であり、

A'は、H、ハロゲン、-CN、-OR（ここで、RはH、アルキル、フルオロアルキル、アルケニル、フルオロアルケニル、アルキニル、フルオロアルキニル、アリール、フルオロアリール、アルカノイル、フルオロアルカノイル、アルケノイル、フルオロアルケノイル、アルキノイル、フルオロアルキノイルである）から選択され、A''は、HまたはR（ここでRは上記と同義である）から選択され、c = 1～300であり、または



(4)

特表平8-507075



式中、

x は上記と同義であり、そして

c' = 2 ~ 20 である、

および、これらの任意の 2 つ以上の混合物より選択される、上記組成物。

9. 診断薬は、局所の酸素濃度の変化により緩和速度の変化を受けることができる、請求項 7 に記載の組成物。

10. 診断薬は、約 22 から 55℃までの温度範囲で、固体から液体への相転移を受けることができる、請求項 7 に記載の組成物。

11. 栄養価のある物質は、アミノ酸、蛋白、核酸、糖、炭水化物、脂溶性ビタミン、脂質、またはこれらの任意の 2 つ以上の組合せより選択される、請求項 3 に記載の組成物。

12. 殻内の薬理活性物質は、生体適合性分散剤中に溶解または懸濁されている、請求項 3 に記載の組成物。

13. 請求項 12 に記載の組成物であって、生体適合性分散剤は、大豆油、ココナツ油、オリーブ油、ペニバナ油、綿実油、4 ~ 30 個の炭素原子を有する脂肪族、脂環式または芳香族炭化水素、2 ~ 30 個の炭素原子を有する脂肪族または芳香族アルコール、2 ~ 30 個の炭素原子を有する脂肪族または芳香族エステル、2 ~ 30 個の炭素原子を有するアルキル、アリールまたは環状エーテル、1 ~ 30 個の炭素原子を有するアルキルまたはアリールハロゲン化物（随時 2 つ以上のハロゲン置換基を有する）、3 ~ 30 個の炭素原子を有するケトン、ポリアルキレングリコール、またはこれらの任意の 2 つ以上の組合せより選択される、上記組成物。

14. 薬理活性物質はそのまま、殻内に封じ込められている。請求項 3 に記載の組成物。

(5)

特表平8-507075

15. 架橋高分子は、天然に存在する高分子、合成高分子、またはこれらの組合せであり、該高分子は架橋の前に、そこにスルフヒドリル基またはジスルフィド結合が共有結合される、請求項1に記載の組成物。

16. 請求項15に記載の組成物であって、天然に存在する高分子は、スルフヒドリル基および／またはジスルフィド結合を含有する蛋白、スルフヒドリル基および／またはジスルフィド結合を含有するポリペプチド、スルフヒドリル基および／またはジスルフィド結合を含有する脂質、スルフヒドリル基および／またはジスルフィド結合を含有するポリ核酸、スルフヒドリル基および／またはジスルフィド結合を含有するポリサッカライドより選択される、上記組成物。

17. 蛋白は、ヘモグロビン、ミオグロビン、アルブミン、インスリン、リゾチーム、免疫グロブリン、 $\alpha$ -2-マクログロブリン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、フィブリノゲン、またはこれらの任意の2つ以上の組合せより選択される、上記組成物。

18. 蛋白はアルブミンである、請求項17に記載の組成物。

19. 蛋白はヘモグロビンである、請求項17に記載の組成物。

20. 蛋白はアルブミンとヘモグロビンの組合せである、請求項17に記載の組成物。

21. 請求項16に記載の組成物であって、ポリサッカライドは、アルギン酸塩、高M含有アルギン酸塩、ポリマンヌロン酸、ポリマンヌロン酸塩、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸塩、ヘパリン、デキストラン、キトサン、キチン、セルロース、デンプン、グリコーゲン、グアールガム、イナゴマネガム、デキストラン、レバン、イヌリン、シクロデキストラン、アガロース、キサントガム、カラゲナン、ヘパリン、ペクチン、ゲランガム (gellan gum)、スクレログルカン (scleroglucan)、またはこれらの任意の2つ以上の組合せより選択される、上記組成物。

22. 請求項15に記載の組成物であって、合成高分子は、システイン残基および／またはジスルフィド基を含有する合成ポリアミノ酸、スルフヒドリル基および／またはジスルフィド基を含有する合成ポリペプチド、遊離スルフヒドリル基

(6)

特表平8-507075

および／またはジスルフィド基を含有するように修飾されたポリビニルアルコール、遊離スルフヒドリル基および／またはジスルフィド基を含有するように修飾されたポリヒドロキシエチルメタクリレート、遊離スルフヒドリル基および／またはジスルフィド基を含有するように修飾されたポリアクリル酸、遊離スルフヒドリル基および／またはジスルフィド基を含有するように修飾されたポリエチルオキサゾリン、遊離スルフヒドリル基および／またはジスルフィド基を含有するように修飾されたポリアクリルアミド、遊離スルフヒドリル基および／またはジスルフィド基を含有するように修飾されたポリビニルピロリドン、遊離スルフヒドリル基および／またはジスルフィド基を含有するように修飾されたポリアルキレングリコール、およびこれらの任意の2つ以上の混合物より選択される、上記組成物。

23. 請求項1に記載の組成物であって、気体は、空気、酸素、アルゴン、窒素、一酸化炭素、二酸化炭素、ヘリウム、キセノン、亜酸化窒素、一酸化窒素、二酸化窒素など、およびこれらの任意の2つ以上の組合せより選択される、上記組成物。

24. 架橋した高分子のジスルフィド結合は超音波照射により生成される、請求項1に記載の組成物。

25. 請求項1に記載の組成物であって、生物製剤を含有する高分子殻は、生体適合性媒体に懸濁され、該生体適合性媒体は、水、緩衝化水性媒体、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、アミノ酸の溶液、蛋白の溶液、糖の溶液、ビタミンの溶液、炭水化物の溶液、合成高分子の溶液、脂質含有エマルジョン、またはこれらの任意の2つ以上の組合せより選択される、上記組成物。

26. 請求項1に記載の組成物であって、高分子殻は適切な物質で修飾され、該適切な物質は、合成高分子、リン脂質、蛋白、ポリサッカライド、界面活性剤、化学的修飾剤、またはこれらの組合せより選択され、該物質は随時共有結合により高分子殻に結合している、上記組成物。

27. インビボ送達のための生物製剤の調製方法であって、ジスルフィド結合により架橋されることができる生体適合性物質と生物製剤を含有する水性媒体を、ジスルフィド結合による生体適合性物質の架橋を促進するのに十分な時間、高強

(7)

特表平8-507075

度超音波条件に付することよりなり、該製剤は実質的に完全に高分子殻内に封じ込められ、そして核の最大の断面の大きさは約10ミクロン以下である、上記方法。

28. 有効量の請求項1の組成物を対象者に投与することよりなる、対象者に生物製剤を送達する方法。

29. 有効量の請求項2の組成物を対象者に投与することよりなる、対象者に血液代替物を送達する方法。

30. 有効量の請求項25の組成物を対象者に投与することよりなる、対象者に生物製剤を送達する方法。

31. 請求項8に記載の組成物を対象者に投与することよりなる、インビボで磁気共鳴画像を得る方法。

32. タキソール (taxol) のインビボ送達用の組成物であって、タキソールは生体適合性液体に懸濁され、そして得られる懸濁物は、断面の大きさが約10ミクロン以下のタキソールの粒子を含有する、上記組成物。

33. インビボ送達用のタキソールの調製方法であって、断面の最大の大きさが約10ミクロン以下の粒子を産生するのに十分な時間、タキソールと水性媒体を超音波照射と摩砕条件に付することよりなる、上記方法。

34. ポリ陰イオンに結合した常磁性陽イオンよりなる組成物。

35. 有効量の請求項34に記載の組成物を対象者に投与することよりなる、MRI造影剤として有用な常磁性陽イオンを対象者に送達する方法。

(8)

特表平8-507075

## 【発明の詳細な説明】

## 生物製剤のインビボ送達の方法とそのための組成物

発明の分野

本発明は、生物製剤 (biologics) のインビボ送達に関する。1つの面において、生物製剤は、生体適合性物質より製剤化される高分子殻 (polymeric shell) に結合している。生物製剤は高分子殻自身に結合しているか、および／または生体適合性分散剤中に随時懸濁／分散された生物製剤を高分子殻内に入れることができる。別の面において、高分子殻に結合した生物製剤は、適切な生体適合性の液体中に随時分散させて、患者に投与される。

発明の背景

血液中に存在する微粒子や外来物質は、一般的に「血液ろ過臓器」(すなわち脾臓、肺および肝臓)により循環系から排除される。正常な全血中に含まれる粒子には、赤血球(典型的には直径8ミクロン)、白血球(典型的には直径6~8ミクロン)、および血小板(典型的には直径1~3ミクロン)がある。これらの血球細胞は、多くの臓器や組織の微小循環系を自由に通過する。10~15ミクロン以上の大きさの微小血栓(血液凝固塊)が循環系に存在すると、梗塞や毛細管の閉塞が発生する危険があり、虚血(すなわち酸素欠乏)や組織の死に至ることがある。従って、直径10~15ミクロン以上の粒子の循環系への注入は避けなければならない。しかし7~8ミクロン未満の粒子の懸濁物は比較的安全であり、リボソームやエマルジョン、栄養剤、および造影目的の造影媒体の形で薬理活性物質の送達に使用されてきた。

粒子の大きさやその送達方法が、その生物学的行動を決定する。ストランド(Strand)ら(Microspheres-Biomedical Applications、レンバウム(A. Rembaum)編、193-227頁、CRC出版(1988))は、粒子の運命はそのサイズに依存していることを記載している。数ナノメートル(nm)から100nmの範囲の大きさの粒子は、間質への注入後リンパ毛細管系に入り、リンパ節内で食作用が起きる。約2ミクロン未満の粒子は、静脈／動脈への注射後、網内系(RE S)

(9)

特表平8-507075

(単核球食作用系(MPS)としても知られている)により、容易に血流から排除される。約7ミクロンより大きい粒子は静脈注射後、肺の毛細管中に捕捉される。動脈注射後は、粒子は最初に到達した毛細血管床に捕捉される。吸入された粒子は、肺胞のマクロファージにより捕捉される。

水不溶性またはわずかに水溶性であるが胃の中の酸性環境に感受性のある薬剤は、従来の方法(例えば、静脈注射または経口投与)で投与することができない。このような薬剤の非経口投与は、界面活性剤またはエマルジョン安定化剤の存在下で、油状物で可溶化した薬剤を水性液体(例えば正常な生理食塩水)でエマルジョン化して、安定な微小エマルジョンを産生させることにより達成されている。エマルジョンの成分が薬理学的に不活性であるならば、これらのエマルジョンは静脈注射することができる。例えば、米国特許第4,073,943号は、油状物に溶解し、卵リン脂質、プルーロニクス(pluronics)(ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体)、オレイン酸ポリグリセロールなどの界面活性剤の存在下で水でエマルジョン化した、水不溶性の薬理学的に活性な物質の投与を記載している。PCT国際公報WO85/00011号は、皮下または静脈注射に適した大きさを有する、リン脂質(例えばジミリスティルホスファチジルコリン)でコーティングした麻酔薬について記載している。

蛋白微小球は、薬剤または診断薬の担体として文献に記載されている。アルブミンの微小球が、熱変性または化学的架橋により調製されている。熱変性微小球は、100℃～150℃の温度でエマルジョン化した混合物(例えば、取り込むべき媒体であるアルブミンと適切な油状物)から産生される。次に微小球を適切な溶媒で洗浄し、保存する。リュウキュータ(Leucuta)ら[International Journal of Pharmaceutics、41巻:213-217(1988)]は、熱変性微小球の調製について記載している。

化学的に架橋した微小球の調製方法では、エマルジョンをグルタルアルデヒドで処理して蛋白を架橋した後、洗浄し保存する。リー(Lee)ら[Science、213巻:233-235(1981)]および米国特許第4,671,954号は、この調製法について記載している。薬理活性物質の担体としての蛋白微小球の調製についての上記方法は、水溶性物質の送達に適しているが、水不溶性物質を

(10)

特表平8-507075

捕

捉することはできない。油中水エマルジョンの水相中の蛋白成分の架橋または熱変性に依存する調製法では、この限界は本質的なものである。蛋白を含有している水相に溶解している水溶性物質は、得られる架橋または熱変性蛋白マトリックス中に捕捉することはできるが、あまり水に溶けないか脂溶性の物質は、これらの技術で作成される蛋白マトリックス内に取り込むことはできない。

すなわち、水溶性の低い多くの生物製剤は、ヒトに投与するときに問題となる。水性媒体に本質的に不溶性であるかまたはほとんど不溶性の薬理活性物質の送達、経口送達が有効でない場合、大きく障害される。従って水性媒体に本質的に不溶性であるかまたはほとんど不溶性の薬理活性物質の送達のために現在使用されている方法は、薬理活性物質を可溶化する物質の添加を必要とする。しかし薬理活性物質を可溶化するのに使用されるこれらの物質（例えば乳化剤）により、しばしば重篤なアレルギー反応が引き起こされる。従って薬剤送達を助けるために使用される生物製剤のアレルギー性副作用を低下させるために、通常の投与方法には、生物製剤の注射の前に抗ヒスタミン剤やステロイド剤を患者に投与することを含んでいる。

水性媒体に本質的に不溶性であるかまたはほとんど不溶性の薬剤の水溶性を改良するために、数人の研究者は、水溶性を上昇させる官能基で薬剤の構造を化学修飾している。当該分野で記載されている化学修飾には、素晴らしい生物活性を示すスルホン化誘導体〔キングストン (Kingston) ら、米国特許第5,059,699号(1991)〕、そしてアミノ酸エステル〔マシュー (Mathew) ら、J. Med. Chem.、35巻:145-151頁(1992)〕の調製物がある。水溶性誘導体を産生させる修飾は、本質的に不溶性のであるかまたはほとんど不溶性の薬剤の、水性媒体（生理食塩水のような無毒の担体中に溶解されている）中の静脈内送達を促進する。しかし、このような修飾は、薬剤調製のコストを上昇させ、好ましくない副作用および／またはアレルギー反応を誘発し、薬剤の効力を低下させる可能性もある。

しばしば送達が困難な生物製剤には酸素がある。赤血球代替物（「血液代替物

(11)

特表平8-507075

」または「人工血液」)として、使用に際し臨床上安全で有効な酸素運搬媒体に対するニーズは強調しすぎることはない。このような媒体の利用の可能性とし

ては、(a)一般的な輸血用途(通常の輸血、および急性の血液の損失を補うための緊急輸血も含む)、(b)移植中のインビトロの、または手術中のインビボの臓器の維持、(c)インビボでの虚血組織や臓器への酸素送達、(d)放射線療法や化学療法の効果を上げるための、血管新生の不十分な癌への酸素送達の上昇、(e)研究実験中の臓器または動物の維持、および(f)培地中の生きている細胞への酸素輸送の増加がある。

輸血は、血液量の減少、すなわち血液量減退症(出血に起因する)、血球数の減少(骨髄破壊に起因する)、血球の障害(溶血性貧血に起因する)などの種々の疾患の患者の血液力学系を補助するために使用される。輸血は血管内の量を増加させるのみならず、溶解酸素を運搬する赤血球を供給し、組織への酸素送達を促進するのに役立つ。

従って、大量の血液喪失を経験した患者の輸血では、供血者と受血者の血液型の注意深いマッチングにより、患者は酸素の欠乏の時期がありこれは危険である。さらに患者の静脈切開や保存により患者の自己の供血液を使用する場合でも、保存の結果これらの自己血細胞の酸素運搬能と安全性は低下する。従って輸血後24時間もの間、患者は酸素の送達に対する非最適状態に置かれることがある。最後に、全血およびこれに由来する赤血球の輸血のすべてに、ウイルスおよび/または細菌感染の危険が常に存在する。

従って、通常的环境条件下で酸素の輸送と送達に有用な、下記の特徴を有する物質に対する確実なニーズがある。理想的には、酸素の輸送と送達に使用される物質は、装置、臓器および組織に酸素を運搬および送達できて、これらの環境下で正常な酸素圧が維持されるものである。このような物質は、理想的には安全かつ非毒性であり、細菌および/またはウイルスの汚染がなく、非抗原性であり、非発熱性(non-pyrogenic)(すなわち0.25 EU/ml未満)である。さらに、酸素の輸送と送達に使用される物質は、血液と等しい粘度、コロイド性および浸透圧性を有する。このような物質が長時間患者の血管系に保持されて、患者自身



(12)

特表平8-507075

の赤血球の生成や成熟を可能にすることが好ましい。さらに、使用される物質は、赤血球生成を妨害したり阻止したりしないことが好ましい。

現在、急性の血液量減退症の治療には多くの静脈液 (intravenous fluids) (例

えば、乳酸化リンゲル液または生理食塩水のようなクロスタロイド、および正常ヒト血清アルブミンのようなコロイド溶液) が使用可能である。クリスタロイドやコロイドは容量の減少を一時的に補正するが、組織への酸素の送達を直接補うことはない。輸血は好ましい治療法であるが、十分な量の血液が安定に供給されるか否かが絶えず問題である。

好ましくない副作用および／またはアレルギー反応が最少であって、水性媒体に本質的に不溶性であるかまたはほとんど不溶性の薬理活性物質であり、無害な担体 (例えば正常な生理食塩水) に溶解して投与することが好ましい薬理活性物質としては、さらに造影剤のような診断薬がある。造影剤は組織 (すなわち、その位置、大きさおよび配置)、および他の構造を、周りの媒体から可視化することを増強するため、造影剤は放射線画像法に好ましい。例えば軟組織は、著しく異なる生物機能を有する (例えば、肝臓および脾臓) が、類似の細胞組成 (すなわちこれらは主に水よりなる) を有する。

磁気共鳴画像 (MRI) または核磁気共鳴 (NMR) 画像の技術は、放射線一周波数照射を用いて、ある磁界をかけてある種の原子核を検出することに依存する。これは軟組織の解像度が極めて優れている可能性により、臓器の断面画像を (ある場合には) 与えるため、これはある意味ではX線コンピューター断層装置 (CT) に似ている。現在の使用法では、この映像は臓器や組織のプロトンの分布地図である。しかし、X線コンピューター断層装置と異なり、MRIはイオン化放射線を使用しない。従ってMRIは、安全で非侵襲的な医学的画像法である。

NMRの現象は1954年に発見されたが、これが内部構造のマッピングの手段として医学診断に使用されるようになったのは、つい最近である。この技術は最初、ラウテバー (Lauterbur) (Nature、242巻: 190-191頁 (19

(13)

特表平8-507075

73))により開発された。

適切な核スピンを有する核が、磁界をかけた方向に整列することはよく知られている。核スピンは、外部の磁界に沿うか、またはこれに反するという2つの方法のいずれかにより整列する。磁界に沿った整列がより安定であり、安定度の低い状態(すなわち磁界に反する整列)では、整列するためにエネルギーを吸収する必要がある。プロトンの場合には、これらの核は1テスラ(tesla)(1テスラ

=10<sup>4</sup>ガウス)の磁界中で42.6MHzの振動数で前進または共鳴する。この振動数では、放射能の放射線-振動数(RF)パルスが核を励起し、そのスピンの配向を磁界とは反対の方向に変化させて整列させる。RFパルスの後に、励起された核は「緩和」され、すなわち平衡に戻り、磁界の方向に沿って整列する。この緩和シグナルの崩壊は、2つの緩和用語を用いて説明される。 $T_1$ (縦緩和時間のスピン-格子緩和時間)は、外部磁界の方向に沿って核が平衡に戻るのに要する時間である。第2の $T_2$ (スピンスピン緩和時間)は、最初は位相のそろっていた各プロトンスピンの前進の位相をずらすのに関係する時間である。異なる哺乳動物種の種々の体液、臓器および組織の緩和時間は十分に記録されている。

MRIの1つの利点は、異なる走査平面とスライスの厚さが、分解能を落とすことなく選択できることである。このため高性能の横断像、頭頂像、矢状像が直接得られる。MRI装置には機械的駆動部分がないため、その信頼性が高い。一般的には、組織の選択的検査に関しては、MRIはX線コンピューター断層装置(CT)より将来性が大きいと考えられている。CTでは、X線減弱係数のみが画像のコントラストを決めるが、磁気共鳴画像法では、少なくとも3つの異なる変数( $T_1$ 、 $T_2$ 、および核スピンの密度)が寄与している。

MRIは、臓器や組織の間のわずかの物理化学的差異により、組織の型を区別し、X線やCTでは検出できない疾患を検出することができる。これと比較して、CTやX線は組織や臓器の電子密度の差異のみに感受性がある。MRI技術により得られる像は平面的分解能が高いため、医師はCTで得られるよりも小さな構造物を検出することができる。さらに、MRIでは横断像、頭頂像、矢状像な

(14)

特表平8-507075

どの任意の走査平面が容易に得られる。

現在MRIは、多くの医学的疾患の診断の補助に使用されている。その例としては、関節の傷害、骨髄疾患、軟組織癌、縦隔浸潤、リンパ節症、海綿性血管腫、血色素症、肝硬変、腎細胞癌、子宮平滑筋腫、腺筋症、子宮内膜症、乳癌、狭窄症、肝動脈疾患、大動脈切開、脂肪腫肥大、心房中隔、狭窄性心嚢炎などがある〔例えば、エーデルマンとワラク (Edelman & Warach)、Medical Progress、328巻：708-716頁(1993)；エーデルマンとワラク (Edelman & Warach)、New England J. of Medicine、328巻：785-791頁(1993)を参照〕。

ルーチンに使用されている磁気共鳴画像法は、現在細胞内の水分子から発生するプロトンシグナルを基礎としている。従って、画像を区別し、各臓器や細胞構造を区別することはしばしば困難である。さらによくプロトンシグナルを区別するには、2つの手段の可能性がある。最初の手段は、ある領域の水分子の $T_1$ と $T_2$ を別の領域と比較して変更することである。例えば、ガドリウムジエチレントリアミン五酢酸 (Gd-DTPA) は、近傍の水分子のプロトン $T_1$ 緩和時間を短縮することにより、得られる画像を向上させる。

前記で示唆したように、常磁性の陽イオン (例えば、Gd、Mn、およびFe) は優れたMRI造影剤である。周りの水のプロトン $T_1$ 緩和時間を短縮できる能力により、他の方法では得られない鮮明なMRI画像を得ることができる。

個々の臓器や細胞の構造を区別する第2の方法は、画像のために別の分子 (造影剤) を導入することである。この第2の方法を用いると、造影剤を使用したところのみ画像が現れる。この方法の利点は、周りの水の干渉を受けることなく画像が得られることである。適切な造影剤は生体適合性 (すなわち、非毒性で、化学的に安定であり、組織と反応しない) があり、身体から排除される前に寿命が来なければならない。

(身体の中に豊富に存在するため) 水素がMRI走査の基礎として典型的に選択されているが、これではコントラストが不十分のため画像は不鮮明となる。従って、他の活性なMRI核 (例えばフッ素) の使用が有効である。種々の診断画

(15)

特表平8-507075

像技術（例えば、超音波、磁気共鳴、放射線およびコンピューター断層技術）におけるある種の過フッ化炭化水素の使用が記載されている〔SPIE、626、XIV/PACS IV、18-23頁（1986）を参照〕。フッ素は普通体内には存在しないため、フッ素の使用は有効である。

医学診断目的の磁気共鳴画像法に有用なフッ素含有化合物に対する先行技術の記載は、水溶性であってエマルジョンを形成することができる、選択された群のフッ素含有分子に限定されている。従って、水溶性過フッ化炭化水素の過フッ化炭化水素エマルジョンの先行技術は多くの欠点を有し、例えば、1）不安定なエマルジョンを使用している、2）臓器特異性とターゲッティングが欠如している、3）

乳化剤や界面活性剤を使用するためにアレルギー反応を誘発する可能性（例えば、卵リン脂質や卵白レシチン）がある、4）送達能力に限界がある、および5）水溶性過フッ化炭化水素は、静脈注射後直ちに血液で希釈される。

#### 発明の簡単な説明

本発明において、水性懸濁液中の非経口投与に適した微小球の形で、生物製剤のインビボ送達に有用な組成物が与えられる。本発明の組成物は、高分子殻に結合した生物製剤（固体、液体、または気体として）よりなる。高分子殻は、ジスルフィド結合の存在により架橋した、生体適合性物質である。生物製剤に結合した高分子殻は、投与のために随時生体適合性媒体中に懸濁される。生物製剤の送達のために本発明の組成物を使用することにより、生物製剤を、例えば正常な生理食塩水で希釈したエタノールおよびポリエトキシ化ひまし油を含有するエマルジョン中の生物製剤を投与する必要がなくなる（例えば、ノートン（Norton）ら、Abstracts of the 2nd National Cancer Institute Workshop on Taxol & Taxus, September 23-24, 1992を参照）。このような公知の組成物の欠点は、アレルギー性副作用を引き起こしやすいことである。

本発明の別の面において、本発明に従い調製蛋白ヘモグロビン（Hb）の不溶性の作成体は、酸素に可逆的に結合することが、驚くべきことにそして予想外に発見された。本発明の不溶性のヘモグロビン作成体は、赤血球中の可溶性ヘモグロ

(16)

特表平8-507075

ビン分子、または先行技術において血液代替物の可能性があるとして記載されている修飾ヘモグロビン分子で得られる酸素親和力と同じ親和力で酸素に結合する。

本発明のさらに別の面において、高分子殻中に生物製剤を捕捉する方法が与えられる。さらに本発明において、局所の酸素および温度を得る手段、および体の臓器や組織のフッ素磁気共鳴画像を得る手段が与えられる。

微小球懸濁物の形の生物製剤の送達は、異なるサイズの粒子、および異なる経路による投与を使用することにより、肝臓、肺、脾臓、リンパ循環系などの臓器へのある程度のターゲティングが可能になる。本発明の送達方法は、はるかに少ない量の液体を使用し、先行技術の送達系で必要な用量や時間（例えば、タキソール（taxol）のヒトへの典型的な投与量の200-400mgを送達するのに、24時間かけて約1-2リットルの液体を静脈注入する必要がある）に比較しては

るかに少ない投与時間で投与できるため、実質的に水不溶性の薬理活性物質のような生物製剤の投与が可能になる。

例えば、本発明の高分子殻の懸濁物は、静脈内に投与することができ、血管系臓器（例えば、肝臓、脾臓、リンパおよび肺）や骨髄のイメージングが可能になる。臓器ターゲットの特異性は、網内系（RES）（単核食細胞（MNP）系としても知られている）によるミクロンサイズの有機フッ素含有高分子殻の摂取の結果として達成される。肝臓や脾臓などの臓器は、血流から外来物質（例えば、粒子状物質）を除去するのに重要であり、従ってしばしば「血液濾過臓器」と呼ばれる。これらの臓器はRESの大部分を占める。さらに、リンパ循環系中のリンパ節はRESの細胞を含む。従って、本発明のミクロンサイズの有機フッ素含有高分子殻を用いることにより、リンパ系のイメージングが可能である。経口投与または坐剤としての投与により、胃や胃腸管系のイメージングが行われる。このような懸濁物はまた、非血管系のスペース（例えば、脳脊髄腔）に注入され、このようなスペースのイメージングが可能になる。

本発明のさらなる実施態様において、Gd、Mn、Feなどの常磁性陽イオンは、多

(17)

特表平8-507075

価陰イオン（例えばアルギン酸）に結合し、有効なMRI造影剤として使用される。

本発明は、1) 生物製剤を含有する注射可能な高分子殻の懸濁物、2) 単純なエマルジョンに比較して安定性が向上している型の生物製剤、3) RES系またはMNP系による本発明の高分子殻の摂取による、臓器ターゲティング特異性（例えば、肝臓、脾臓、肺など）、4) 乳化剤のない系（従って、アレルギー反応を起こす可能性のある物質を避ける）、5) 本発明の生物製剤含有高分子殻は特異的臓器にターゲティングできることによる、比較的少量の生物製剤を注入しても良好な応答が得られる能力、を提供することにより、先行技術の欠点を克服している。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明に従って調製された高分子殻の模式図である。図中、Aは不溶性のジスルフィド結合架橋高分子殻であり、Bは高分子殻の内部を示し（これは酸素または別の気体、溶存酸素を含有する過フッ化炭化水素、その中に生物製剤を溶解して含有する生体適合性エマルジョン、水性媒体中に生物製剤を溶解して

含有する油中水エマルジョン、液体中に分散した固体粒子の懸濁物などを含有することができる）、Cは高分子殻の厚さを示し、典型的には約5～50ナノメートルであり、Dは高分子殻の直径を示し、典型的には約0.1～20ミクロンの範囲である。

図2は、間質を含まないヘモグロビンの溶液（破線の曲線）と、本発明の不溶化ヘモグロビン作成体を含有する溶液（実線の曲線）の、酸素結合曲線（すなわち、酸素分圧の関数としてのヒル（Hill）係数（n）のグラフ）を示す。

図3は、アロステリックエフェクターである1.7mMの2,3-ビスホスホグリセレート（2,3-BPG）で処理した後の、間質を含まないヘモグロビンの溶液（破線の曲線）と、本発明の不溶化ヘモグロビン作成体を含有する溶液（実線の曲線）の、酸素結合曲線を示す。本発明の不溶化ヘモグロビン作成体の実際のデータ点は、黒四角で示してある。

#### 本発明の詳細な説明

(18)

特表平8-507075

本発明において、生物製剤 (biologic) のインビボ送達のための組成物が与えられ、ここで生物製剤は、

生体適合性分散剤中に随時分散され、高分子殻内に実質的に完全に封じ込められた固体、

生体適合性分散剤中に随時分散され、高分子殻内に実質的に完全に封じ込められた液体、

生体適合性分散剤中に随時分散され、高分子殻内に実質的に完全に封じ込められた気体、

高分子殻に関連した気体、またはそれらの任意の2つ以上の混合物よりなる群から選択され、

核の最大の断面の大きさは約10ミクロン以下であり、

高分子殻は、実質的にジスルフィド結合により架橋した生体適合性物質よりなり、高分子殻の外部は、随時共有結合により高分子殻に結合した適切な物質により随時修飾されている。

本発明において、「インビボ送達」という用語は、経口、静脈内、皮下、腹腔内、髄膜内、筋肉内、頭蓋内、吸入的、局所的、経皮的、坐剤 (直腸内)、ペッ

サリー (膣坐剤) 投与などの経路による、生物製剤の送達を意味する。

本発明において、「生物製剤」という用語は、薬理活性物質 (例えば、鎮痛薬、麻酔薬、抗喘息薬、抗生物質、抗うつ剤、抗糖尿病薬、抗真菌剤、抗高血圧剤、抗炎症薬、抗新生物剤、不安緩解剤、酵素活性剤、核酸作成体、免疫刺激剤、免疫抑制剤、薬理活性ガス、ワクチンなど)、診断薬 (例えば、超音波造影剤、放射性造影剤、または磁気造影剤)、栄養価のある物質などを意味する。

本発明において、「ミクロン」という用語は、1ミリメートルの千分の1の大きさを意味する。

本発明の実施において高分子殻の作成のためにいくつかの生体適合性物質が使用される。本発明において、「生体適合性」という用語は、その物質が導入される生体系を好ましくない方向に、顕著に変化または影響させない物質を意味する。ジスルフィド結合で架橋した核の調製には、その構造内にスルフヒドリル基ま

(19)

特表平8-507075

たはジスルフィド結合を有する基本的に任意の物質（天然または合成）を使用することができる。このスルフヒドリル基またはジスルフィド結合は、生体適合性物質内にあらかじめ存在していてもよいし、適切な化学修飾により導入することもできる。例えば、蛋白、ポリペプチド、オリゴペプチド、ポリヌクレオチド、ポリサッカライド（例えば、ヒアルロン酸など）、脂質などの天然に存在する生体適合性物質は、このような修飾の候補である。エステル、アミド、エーテルなどの他の結合も、（必要な官能基が出発物質上に存在するならば）超音波照射工程で作成することもできる。

天然または合成蛋白が十分なスルフヒドリル基またはジスルフィド基を有し、（例えば超音波照射時の酸化の結果として）架橋が形成されるならば、適切な生体適合性物質としてこのような蛋白を使用することができる。適切な蛋白の例には、アルブミン（35個のシステイン残基を有する）、インスリン（6個のシステイン残基を有する）、ヘモグロビン（ $\alpha_2$   $\beta_2$ ユニットにつき、6個のシステイン残基を有する）、リゾチーム（8個のシステイン残基を有する）、免疫グロブリン、 $\alpha$ -2-マクログロブリン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、フィブリノゲンなど、およびこれらの任意の2以上の組合せがある。

高分子殻の作成に使用するのに現在好適な蛋白はアルブミンである。高分子殻

の作成に使用するのに現在好適な別の蛋白は、ヘモグロビンである。高分子殻の作成に使用するのに現在好適なさらに別の蛋白は、アルブミンとヘモグロビンの組合せである。マクロファージ様の細胞による、核に包まれた生物製剤の粒子の摂取を増進するため、または核に包まれた粒子の肝臓や脾臓への摂取を増進するために、公知のオプソニンである $\alpha$ -2-マクログロブリンを随時使用することもできる。他の機能性蛋白（例えば、目的の部位への生物製剤のターゲティングを促進する抗体や酵素）も、高分子殻の作成に使用することができる。

同様に、スルフヒドリル基またはジスルフィド基を含有する合成ポリペプチドも、高分子殻を有する粒子の作成のための良好な候補である。さらに、ポリアルキレングリコール（例えば、直鎖または分岐鎖）、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクリル酸、ポリエチルオキサゾリン、



(20)

特表平8-507075

ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドンなども、（スルフヒドリル基および／またはジスルフィド結合を導入するための）化学修飾、および（その架橋を発生させるための）核作成の良好な候補である。

本発明の組成物の調製において、生物製剤を懸濁または溶解するために、分散剤を使用することができる。本発明の実施において使用される分散剤は、生物製剤を懸濁または溶解することができるが、核を生成させるために使用される高分子または生物製剤自身とは化学的に反応しない、任意の液体である。例としては、植物油（例えば、大豆油、鉱物油、コーン油、菜種油、ココナツ油、オリーブ油、ペニバナ油、綿実油など）、4～30個の炭素原子を有する脂肪族、脂環式または芳香族炭化水素（例えば、*n*-ドデカン、*n*-デカン、*n*-ヘキサン、シクロヘキサン、トルエン、ベンゼンなど）、1～30個の炭素原子を有する脂肪族または芳香族アルコール（例えば、オクタノールなど）、2～30個の炭素原子を有する脂肪族または芳香族エステル（例えば、カプリル酸（オクタノン酸）エチルなど）、2～30個の炭素原子を有するアルキル、アリールまたは環状エーテル（例えば、ジエチルエーテル、テトラヒドロフランなど）、1～30個の炭素原子を有するアルキルまたはアリールハロゲン化物（および、随時2つ以上のハロゲン置換基、例えば、 $\text{CH}_3\text{Cl}$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 、 $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ など）3～30個の炭素原子を有するケトン（例えば、アセトン、メチルエチルケトンなど）、ポリ

ルキレングリコール（例えば、ポリエチレングリコールなど）、またはこれらの任意の2つ以上の組合せがある。

分散剤の特に好適な組合せには、ジクロロメタン、酢酸エチル、ベンゼンなど（すなわち、薬理活性物質に対して高い溶解性を有し、使用される他の分散剤に溶解する溶媒）の揮発性液体と、揮発性の低い分散剤との組合せがある。これらの揮発性付加物は他の分散剤に加えられる時、分散剤への薬理活性物質の溶解を促進するのを助ける。この工程は通常時間がかかるため、これは好ましい。溶解後これらの揮発性成分は、（随時真空下での）蒸発により除去される。

前述のように調製され、実質的に完全に高分子殻内に封じ込められているか、

(21)

特表平8-507075

またはこれと結合している生物製剤の粒子は、希釈なしでまたは随時生体適合性媒体中の懸濁物として送達される。この媒体は、水、緩衝化水性媒体、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、随時緩衝化したアミノ酸溶液、随時緩衝化した蛋白の溶液、随時緩衝化した糖の溶液、随時緩衝化した炭水化物の溶液、随時緩衝化したビタミンの溶液、随時緩衝化した合成高分子の溶液、脂質含有エマルジョンなどから選択される。

本発明の別の実施態様において、インビボ送達のための生物製剤の調製法が与えられ、この方法は、ジスルフィド結合により架橋されることができ生体適合性物質と生物製剤を含有する媒体を、高強度の超音波条件下で、ジスルフィド結合により生体適合性物質の架橋を促進するのに十分な時間処理することによりなり、生物製剤は実質的に完全に高分子殻内に封じ込められており、そして核の最大の断面の直径は約10ミクロン以下である。

すなわち本発明においては、高分子殻内に封じ込められた生物製剤は、高強度超音波を用いて合成される。安定な高分子殻の作成には、2つの非線形音波法が用いられる。まず音波乳化法により、生物製剤を蛋白水溶液中に分散させる。生成した分散物を、次にジスルフィド結合により化学的に架橋し安定化させる。(高分子がアルブミンのような蛋白である場合)ジスルフィド結合は、音波空 cavitation)により産生されるスーパーオキシドにより、システイン残基が酸化されて作成される。

得られる懸濁物は随時セントリコン (centricon) フィルター (カットオフ 10

0キログルトン)により濾過され、濾過した作成体または微小気泡 (microbubbles) は、正常な生理食塩水または適切な緩衝液に再懸濁される。図1は、このような作成体の模式図である。これらの作成体の平均直径は約2ミクロンである。エルゾン (Elzone) 粒子カウンターで計測した、粒子サイズの分布は非常に狭い (平均直径約3ミクロンのガウス分布が典型的に観察される)。この方法により得られる粒子のサイズの範囲は、0.1~20ミクロンである。好適なサイズ範囲は0.5~10ミクロンであり、最も好適な範囲は1~5ミクロンである。こ

(22)

特表平8-507075

のサイズは小さい血管を詰まらせたり、その後組織傷害（酸素欠乏による虚血）を起こしたりする危険なしで、静脈注射または動脈注射できるため、理想的なサイズである。比較のために、正常な赤血球の直径は約8ミクロンである。

前述の方法で明白でない特徴は、特に分散剤の極性に関する、分散剤の選択である。生物製剤のまわりの核の形成は、水性層と非水性層の界面での生体適合性物質の再配向を伴い、生体適合性物質内の親水性領域は水性層に露出し、生体適合性物質内の疎水性領域は非水性層を向いて配向する。生体適合性物質が蛋白の場合は、その変性または高次構造の変化のために、この高分子にエネルギーを供給しなければならない。2つの液相（すなわち、水層と非水層）間の界面フリーエネルギー（界面張力）は、その界面での蛋白の高次構造の変化に寄与する。熱エネルギーもまた、蛋白の高次構造の変性および／または変化に必要なエネルギープールに貢献する。

与えられる熱エネルギーは、高強度超音波照射、高強度超音波照射時間、高強度超音波照射処理される物質の本質、高強度超音波照射される物質の量などの変数の関数である。高強度超音波照射方法の音波の強さは、大きく変化し、典型的には約1～1000ワット/cm<sup>2</sup>の範囲であり約50～200ワット/cm<sup>2</sup>の範囲での範囲が現在好適である。同様に、高強度超音波照射の露出時間は大きく変化し、典型的には数秒から約5分の間である。好適には高強度超音波照射時間は、約15～60秒の範囲である。音波の強度が強ければ高強度超音波照射の露出時間は短く、その逆も同じであることは、当業者は理解できるであろう。

界面フリーエネルギーは、2つの液の間の極性の差に正比例する。すなわち、

ある操作温度では、目的の高分子殻を形成するのに、2つの液体の界面での最小のフリーエネルギーが必要である。すなわち、極性があまり違わない同類の分散剤（例えば、アルカノン酸のエステル）を使用する場合、類似度が高ければより非極性となり、すなわちエステルの炭素原子数が増えたと、これらの分散剤と水の間の界面張力は上昇する。従って、酢酸エチル（すなわち炭素原子2個のエステル）は室温（約20℃）で水と混じり合うが、この分散剤自身では高分子殻被覆粒子（polymer shell-coated particles）の高収率が得られない。これに対し

(23)

特表平8-507075

て、オクタン酸エチル（炭素原子8個のエステル）のような高級エステルは高分子殻被覆粒子を高収率で与える。実際、ヘプタン酸エチル（炭素原子7個のエステル）は中程度の収率を与え、低級エステル（炭素原子3、4、5または6個のエステル）では収率は悪い。すなわち、ある温度において、高収率の高分子殻被覆粒子の作成に必要な水一分散剤間の最小の界面張力の条件を設定できる。

高収率で高分子殻被覆粒子を得るために操作すべきもう1つの変数は温度である。一般に液体の表面張力は温度の上昇とともに低下する。温度による表面張力の変化率は、液体により異なる。例えば、2つの液体の間の界面張力（ $\Delta \gamma$ ）は温度  $T_1$  では  $\Delta \gamma_1$  であり、温度  $T_2$  では  $\Delta \gamma_2$  である。もし、 $T_1$  での  $\Delta \gamma_1$  が本発明の高分子殻を作成するのに必要な最小量に近い場合、そしてもし  $\Delta \gamma_2$ （温度  $T_2$  で）はそれより大きい場合、 $T_1$  から  $T_2$  への温度変化は高分子殻の収率を増加させるであろう。これはヘプタン酸エチルで実際に観察されており、20℃では中程度の収率であるが、10℃では高収率を与える。

温度はまた、使用する液体の蒸気圧に影響を与える。温度が低いと、総蒸気圧は低くなる。総蒸気圧が低ければ、空隙気泡（cavitation bubbles）の崩壊がより効率的になる。さらに効率的な空隙気泡の崩壊は、スーパーオキシド（ $\text{HO}_2^-$ ）生成速度と相関する。スーパーオキシド生成速度が上昇すると、低温度での高分子殻の収率が上昇する。しかしこれに対抗する考え方として、温度の上昇に伴い、スルフヒドリル基の酸化速度（すなわち、ジスルフィド結合の形成速度）が上昇することがある。従って、超音波照射されるある特定の液体については、高収率の高分子殻が得られるかなり狭い範囲の最適操作温度が存在する。

従って、温度による表面張力の変化（これは高分子の変性と高次構造の変化に直接影響する）と、温度による反応収率の変化（反応はジスルフィド結合の形成による高分子の架橋である）の2つの効果の組合せが、高分子殻被覆粒子の総変換収率を決定する。本発明の高分子殻の調製に適した温度は、約0～80℃の範囲にある。

前述の超音波照射法は、ある範囲のサイズを有する生物製剤を含有する高分子殻被覆粒子を産生するために操作される。現在好適な粒子の半径は、約0.1～

(24)

特表平8-507075

約5ミクロンの範囲である。この範囲の狭いサイズ分布が、生物製剤の静脈内送達に非常に適している。次に、高分子殻被覆粒子は、適切な手段で投与する前に、好ましくは生体適合性媒体（前述）中に懸濁される。

さらに高分子殻は、随時適切な物質により修飾される（この物質は、随時共有結合を介して高分子殻に結合している）。このような結合に考えられる共有結合としては、エステル、エーテル、ウレタン、ジエステル、アミド、2級アミンまたは3級アミン、リン酸エステル、硫酸エステルなどがある。この高分子殻の随意の修飾に適した物質には、合成高分子（ポリアルキレングリコール（例えば、直鎖または分岐鎖ポリエチレングリコール）、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクリル酸、ペリエチルオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドンなど）、リン脂質（例えば、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、ホスファチジイノシトール（PI）、スフィンゴミエリンなど）、蛋白（例えば、酵素、抗体など）、ポリサッカライド（例えば、デンプン、セルロース、デキストラン、アルギン酸、キトサン、ペクチン、ヒアアルロン酸など）、化学的修飾試薬（例えば、ピリドキサル5'-リン酸、ピリドキサールの誘導体、ジアルデヒド、ジアスピリンエステルなど）、またはこれらの任意の2つ以上の組合せがある。

高分子殻内に閉じこめられた溶解した生物製剤という一般的主題に対する変種も可能である。分散剤に懸濁された生物製剤の粒子を含有する高分子殻を産生するのに、（溶解した生物製剤を含有する生体適合性分散剤の代わりに）生体適合性分散剤中の生物製剤の微粒子の懸濁物を使用することができる。すなわち、高分子殻は、分散剤中の生物製剤の飽和溶液を含有することができる。もう1つの変種は、まず生物製剤を揮発性有機溶媒（例えば、ベンゼン）中に溶解して高分

子殻を形成させ、真空下（例えば、ロータリーエバポレータ）で溶媒を蒸発させるか、または全懸濁物を凍結乾燥させて産生した、生物製剤の固体核を含有する高分子殻である。これにより高分子コートに囲まれた生物製剤の固体核を有する構造が得られる。この後者の方法は、比較的少量で高用量の生物製剤を送達するのに特に有利である。ある場合には、核のまわりに殻を形成する生体適合性物質

(25)

特表平8-507075

自身を、治療薬または診断薬として使用することができる。例えば、インスリンの場合には、前述の超音波照射法で作成した高分子殻の一部として送達される。別の場合には、殻を形成する高分子が、生物製剤の送達に参加し、例えばヘモグロビンの場合には、前述の超音波照射法により作成された高分子殻の一部として送達され、従って酸素に対する高い結合能を有する血液代替物を提供する。

高分子殻の変種も可能である。例えば、スルフヒドリル基を含有する少量のPEGを、高分子内に含有させることができる。超音波照射をするとPEGは架橋して高分子になり、高分子殻の成分を形成する。あるいは、PEGは、(殻を調製した媒体の一部として含まれるより)殻の調整後高分子殻に結合することができる。

PEGはその非粘着性により知られており、インビボでの循環時間を増加させるために蛋白や酵素に結合されてきた〔アブチョウスキー (Abuchowski) ら、J. Biol. Chem.、252巻:3578(1977)〕。PEGはまた、インビボでの摂取を低下させ寿命を延ばすために、リン脂質に結合されてリボソームの脂質2重層を形成してきた〔クリバノフ (Klibanov) ら、FEBS Letters、268巻:235(1990)〕。すなわち、架橋した蛋白殻の壁へのPEGの導入は、その血液循環時間を変化させる。この性質は、生物製剤の高い血中レベルを維持し、生物製剤の放出時間を延長させるために使用することができる。

高分子殻の修飾に適しているのは、PEG-イミダゾール、コハク酸スクシニミジル、炭酸ニトロフェニル、トレシレート (tresylates) などの求電子性PEG誘導体、そしてPEG-アミン、アミノ酸エステル、ヒトラジド、チオールなどの求核性誘導体である。PEG-修飾高分子殻は非修飾高分子殻よりも、長い時間循環中に存在することが予測される。PEGによる高分子殻の修飾は、殻の作成前または作成後に実施することができる。現在好適な方法は、殻の作成後に高

分子殻を修飾することである。高分子殻の修飾に、デキストラン、アルギン酸塩、ヒドロキシエチルデンプンなどの他の高分子を使用することができる。

本発明の範囲と精神の中でいくつかの変化が可能であることは、当業者は認識

(26)

特表平8-507075

できるであろう。例えば、高分子殻の壁の作成に、高分子殻内の分散剤を変化させたり、他種類の生物製剤を使用したり、広範囲の蛋白および他の天然または合成高分子を使用することができるであろう。その用途もかなり広い範囲にわたる。薬剤、診断薬（イメージング用途）、人工血液（音波化学的に架橋させたヘモグロビン）、および非経口栄養剤などの生物医学的応用以外に、スキนครリームまたはヘアケア製品などの化粧品としての応用、香料への応用、感圧性インキ、殺虫剤などへの応用も可能である。

本発明の1つの実施態様において、前述のように調製した高分子殻は、薬理活性物質、診断薬または栄養価のある物質のような生物製剤の、インビボ送達に使用される。本発明の実施に使用される薬理活性物質の例としては、鎮痛薬（例えば、アセトアミノフェン、アスピリン、イブプロフェン、モルヒネおよびこれらの誘導体）、麻酔性ガス（シクロプロパン、エンフルラン、ハロセン、イソフルラン、メトキシフルラン、亜酸化窒素など）、抗喘息薬（例えば、アゼラストチン、ケトチフェン、トラキサノックス（traxanox）など）、抗生物質（例えば、ネオマイシン、ストレプトマイシン、クロラムフェニコール、セファロスポリン、アンピシリン、ペニシリン、テトラサイクリンなど）、抗うつ剤（例えば、ネフォパム、オキシペルチン、イミプラミン、トラゾドンなど）、抗糖尿病薬（例えば、ビグアニジン（biguanidines）、ホルモン、スルホニル尿素誘導体など）、抗真菌剤（例えば、アンホテリシンB、ナイスタチン、カンジシジンなど）、抗高血圧剤（例えば、プロプラノロール、アルパフェノン、オキシプレノロール（oxyprenolol）、ニフェジピン、レセルピンなど）、ステロイド性抗炎症薬（例えば、コルチゾン、ハイドロコルチゾン、デキサメタゾン、プレドニソロン、プレドニソン、フルアザコート（fluazacort）など）、非ステロイド性抗炎症薬（例えば、インドメタシン、イブプロフェン、ラミフェニゾン（ramifenizone）、ピロキシカムなど）、抗新生物剤（例えば、アドリアマイシン、シクロホスファミド、アクチノマイシン、ブレオマイシン、デュアノルビシン（duanorubicin）、ドキソ

ルビシン、エピルビシン、マイトマイシン、メソトレキセート、フルオロウラシ

(27)

特表平8-507075

ル、カルボプラスチン、カルムスチン (carmustine) (BCNU)、シスプラチン、エトポシド、インターフェロン、フェネステリン (phenesterin)、タキソール (taxol) (本明細書において、「タキソール」という用語は、タキソール類似体やプロドラッグ、タキサン (taxanes)、および他のタキソール様薬剤、例えばタキソテレ (Taxotere) などを包含する)、カンプトテシン (camptothecin) やその誘導体 (これらの化合物は、大腸ガンの治療に対して大きな将来性がある)、ビンブラスチン、ビンクリスチン、およびホルモン性抗新生物剤 (例えば、エストロゲン、プロゲステロン、タモキシフェンなど)、不安緩解剤 (例えば、ダントロレン、ジアゼパムなど)、酵素活性剤 (例えば、DNAse、リボザイムなど)、核酸作成体 (例えば、IGF-1コード配列、第VIII因子コード配列、第IX因子コード配列、アンチセンスヌクレオチド配列など)、免疫刺激剤 (インターロイキン、インターフェロン、ワクチンなど)、免疫抑制剤 (例えば、サクロスポリン (CsA)、アザチオプリン、ミゾリビン、FK506、プレドニソンなど)、薬理活性ガス (例えば、空気、酸素、アルゴン、窒素、一酸化炭素、二酸化炭素、ヘリウム、キセノン、亜酸化窒素、一酸化窒素、二酸化窒素など、およびこれらの任意の2つ以上の組合せ)、および他の薬理活性物質 (例えば、シメチジン、ミトタン、ビスサジン (visadine)、ハロニトロソ尿素、アントラサイクリン (anthracycline)、エリブチシン (ellipticine)、ベンゾカイン (benzocaine)、バルビツール酸塩など)

本発明の実施に使用される診断薬の例としては、超音波造影剤、放射性造影剤 (例えば、ヨードオクタン、ハロカーボン (halocarbons)、レノグラフィン (renografin) など)、磁性造影剤 (例えば、過フッ化炭化水素、脂溶性常時性化合物、GdDTPA、水性常時性化合物など)、および他の物質 (例えば、アルゴン、窒素、一酸化炭素、二酸化炭素、ヘリウム、キセノン、亜酸化窒素、一酸化窒素、二酸化窒素など、およびこれらの任意の2つ以上の組合せ) がある。

本発明の実施に使用される栄養価のある物質の例としては、アミノ酸、糖、蛋白、炭水化物、脂溶性ビタミン (例えば、ビタミンA、D、E、Kなど) または脂肪、またはこれらの任意の2つ以上の組合せ) がある。



(28)

特表平8-507075

本発明の生物製剤含有高分子殻と先行技術の蛋白微小球との間の主要な差は、高分子殻の作成と高分子殻の作成後の蛋白の最終状態、およびわずかに水溶液であるかまたは実質的に水不溶性の物質を運搬する能力にある。本発明においては、高分子（例えば蛋白）は、例えば多くの蛋白の天然の構造中に存在するアミノ酸であるシステインを介して、ジスルフィド結合の形成を介して選択的に化学的に架橋される。超音波照射処理を用いて、スルフヒドリル基またはジスルフィド基を有する生体適合性物質（例えば、アルブミン）の水溶液中に、生物製剤を溶解または懸濁して含有する分散剤を分散させる（ここで、架橋高分子の殻は、非水性媒体の小滴のまわりに形成される）。超音波照射処理は液体の中に空隙（cavitation）を産生させ、これが多量の熱を発生させることによりスーパーオキシドイオンが生成し、これがスルフヒドリル残基を酸化して（および／または、既存のジスルフィド結合を破壊することにより）高分子を架橋して、新規の架橋ジスルフィド結合を形成する。

本発明の方法に対して、先行技術のグルタルアルデヒド法は非特異的であり、基本的に蛋白構造中に存在する任意の求核性基（例えば、アミン、スルフヒドリル基およびヒドロキシル基）と反応する。先行技術の熱変性は、蛋白構造を有意かつ不可逆的に変化させる。これに対して、本発明のジスルフィド結合形成は非常に特異的であり、実質的に蛋白を変性させない。さらに、本発明により産生される高分子殻は、被覆粒子の直径に比較して比較的薄いため、高分子殻内に封じ込められた生物製剤の粒子または小滴は、先行技術の架橋または熱変性蛋白微小球とは異なる。直径1ミクロン（1000ナノメートル）の被覆粒子の、高分子のコートの「殻の厚さ」は約25ナノメートルであることが、（走査電子顕微鏡により）求められている。これに対して、先行技術の微小球は蛋白殻を有さず、蛋白は微小球の容積中に分散されている。

生物製剤の固体、液体または気体の核を含有する高分子殻は、比較的少量で高用量の生物製剤の送達を可能にする。これは、大量の液体を投与される患者の不快感を最小にし、入院期間を最小にする。さらに現在の製剤がしばしばそうであるように、高分子殻の壁は蛋白分解酵素（例えば、高分子が蛋白である時）により、一般的にインビボで完全に分解され、従ってこの送達系からの副作用は全く

(29)

特表平8-507075

ない。

本発明のこの実施態様において、生物製剤の小滴または粒子は、断面の直径が約10ミクロン以下の殻内に封じ込められている。断面積の直径は5ミクロン未満がさらに好ましく、断面積の直径約2ミクロンが、静脈注射投与には現在最も好ましい。

本発明の別の実施態様において、本明細書中に記載した高分子殻は、ヘモグロビンから調製される時、驚くほど高い酸素結合能を有し、従って血液代替物として有用である。ヘモグロビン（レーニンジャー（Lehninger）、Biochemistry、ワース出版（Worth Publishers, Inc）、ニューヨーク、145-149頁、1975）は、4量体（2つの $\alpha$ および $\beta$ 鎖）よりなる分子量64,500の蛋白である。各 $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖は、非共有結合でヘム残基に結合している。 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖はまた、水素結合およびファンデアワールス（van der Waals）力よりなる、非共有結合により結合している。この4つのヘム基（各サブユニットに1つずつある）は、酸素4分子に結合することができる。これらの平面的なヘム基は、四角いプレーナー配置にある4つの鉄原子を含む。完全な分子中では、4つのヘムは、お互いに比較的離れて位置している。

酸素結合時のヘムユニットの相互作用または協働作用は、4量体ヘモグロビン分子内の各ヘムユニットの酸素結合能力を著しく増加させる。一般的に、1つの単離されたヘムユニットは1つの酸素分子に結合すると予想される。しかし、ヘモグロビン分子内の隣接するヘムユニットは協働して、ヘムユニット当たりの結合酸素を増加させる。この協働作用は、「ヒル係数」（Hill Coefficient）として記載され、この値は相互作用する酸素結合部位の数を反映する。天然のヘモグロビンの場合、ヒル係数は約2.8である。

可溶性ヘモグロビンは、赤血球中の総蛋白の約90%を占める。100mlの全血は、ヘモグロビンの結合能力により約21mlの気体状酸素を吸収することができる。酸素の結合と同様に重要なことは、ヘモグロビンはまた結合した酸素を組織に放出することである。ヘモグロビンが酸素を結合し放出する能力は、しばしば定量的に $P_{50}$ （または $P_{1/2}$ ）として表される。例えば、全血の $P_{50}$ （すなわち、ヘモグロビンを50%飽和させる酸素の分圧）は、約28mmHgである。

(30)

特表平8-507075

酸素の分圧とヘモグロビンの飽和率の関係はシグモイド曲線として表され、その位置はpHにより影響される（ボア（Bohr）効果）。ある酸素の分圧でヘモグロビン溶液のpHが高い程、酸素による飽和率が高くなり、 $P_{50}$ は低くなる。すなわち酸素飽和曲線は横軸上で左に移動する。逆に、ヘモグロビン溶液のpHが低い場合、酸素飽和率は低くなり、 $P_{50}$ は高くなる。すなわち酸素飽和曲線は横軸上で右に移動する。すなわち、ヘモグロビンが、肺の比較的アルカリ性のpHから酸素が不足している組織（嫌氣的呼吸により乳酸を放出している）の比較的産生のpHに移動すると、ヘモグロビン分子は持っている酸素を放出し易くなる。従って一般的に、酸素に対するヘモグロビンの親和性は、ヘモグロビンの $P_{50}$ とは反対の方向に変化する。

ヘモグロビン分子またはその高次構造の修飾は、酸素結合親和力に関係がある。例えば、2, 3-ジホスホグリセレート（2, 3-DPG）との結合は、酸素とヘモグロビンとの結合をゆるくして、酸素の組織への放出を促進する。酸素の送達の増加が好ましい場合（例えば、高地にいる場合や妊娠時）には、2, 3-DPGの血清レベルは上昇する。ヘム補欠分子族中の鉄イオンがFe(II)からFe(III)に酸化されると、メトヘモグロビン（met-Hb）が生成し、これは水と協力に結合するため、酸素の移動が排除される。この酸化すなわち「自己酸化」は、インビボで進行している過程であり、赤血球内の酸化還元酵素により維持されている。

酸素輸送と送達のための蛋白であるヘモグロビンは、赤血球細胞壁膜または間質（間質は、血液型を決定する特異的抗原を含有する）から分離され、他の細胞や血漿成分から分離される。このような分離や単離が行われると、生じる間質のないヘモグロビンは抗原性物質を含まない。従って血液の型決定やマッチングは必要でなくなる。

赤血球の微小環境から取った、間質のないヘモグロビンは、あまりにも強く（低い $P_{50}$ ）酸素に結合し輸血後の循環半減期が短くなりやすいことが見いだされた。低い $P_{50}$ （ヘモグロビン酸素結合曲線で左への移動として反映される）は、一部、赤血球中のpH（7.2）よりも高い血漿中のpH（7.4）に、間質のないヘモグロビンが接触した結果である。さらに、赤血球からヘモグロビンを取り除

(31)

特表平8-507075

いた時、ヘモグロビンと2,3-ジホスホグリセレートとの自然の結合は破壊され、従ってさらに $P_{50}$ は低下した。循環系からのクリアランスでは、間質のないヘモグロビン(SFH)は腎臓から急速に排除され、輸血半減期はわずか約100分である。SFHのヒル係数は、2.3~2.8の範囲である。

間質のないヘモグロビンの欠点のいくつかに取り組む化学的に修飾されたヘモグロビンを研究した。先行技術で記載された修飾は、間質のないヘモグロビンの分子内架橋のための種々の手段、低分子量物質による間質のないヘモグロビンの分子内架橋のための手段、低分子量物質による間質のないヘモグロビンの分子内および分子間架橋のための手段、そして間質のないヘモグロビンを他の高分子に結合させるための手段がある。

間質のないヘモグロビンの分子内架橋法は、当該分野で公知である。例えば、米国特許第4,584,130号、第4,598,064号、および第4,600,531号を参照。この処理は、フマル酸ブリッジを介してヘモグロビンのアルファ鎖上のリジン-99を共有結合することにより、間質のないヘモグロビンを修飾する。この分子内架橋の結果として、ジアスピリン(diaspirin)架橋ヘモグロビンは血液のヘモグロビンに等しい酸素親和力を有する。さらにジアスピリン架橋ヘモグロビン(分子量64,500)は、これ以上2量体(分子量32,350)に分解しない。その結果、ジアスピリンアルファ-アルファ架橋ヘモグロビンの保持時間は、4~8時間である(これは間質のないヘモグロビンの2~4倍である)。しかし、患者が大量の血液を喪失した場合、酸素運搬体は数日間酸素を運搬できることが必要であるため、これは急性出血の治療での使用については十分に長い時間ではない。ジアスピリン架橋ヘモグロビンの $P_{50}$ は、ヒル係数と(2.5~2.8)と同様に生理的範囲(24~28 mmHg)内にある。

ヘモグロビン分子はまた、低分子量架橋剤を使用して、お互いに分子間架橋されてきた。例えば、ジアルデヒドを用いてヘモグロビンのお互いの、および/または血清蛋白およびゼラチン誘導体との結合(この後随時ピリドキサルリン酸を加える)は、米国特許第4,336,248号に記載されている。2官能性または多官能性の低分子量架橋剤による架橋は、米国特許第4,001,401号、第4,001,200号、第4,053,590号および第4,061,73

(32)

特表平8-507075

6

号に記載されている。分子内ヘモグロビン架橋の生成物は、単一の可溶性4量体ではなく、共有結合して可溶性オリゴマーを形成した複数の4量体である。典型的にはこのような分子間架橋の生成物は、血液とは異なる酸素運搬性および送達性を有する（全血の $P_{50}$ は28であるのに対して、グルタルアルデヒドで重合したヘモグロビンの $P_{50}$ 18~23であり、ヒル係数は1.8~2.8の範囲にある）。さらに、グルタルアルデヒドにより分子間架橋した先行技術の生成物は抗原性であることが知られている〔マークス(D, H, Marks)ら、Military Med.、152巻：473(1987)〕。

一般的に、ヘモグロビンの分子内および分子間架橋は、修飾していないヘモグロビンの $\alpha\beta$ -2量体への解離により引き起こされる腎毒性をある程度減少させる。しかし、可溶性ヘモグロビンの示すコロイド性浸透圧(COP)は、分子内架橋によっては有意に低下しない。従ってこれは、投与に適した可溶性ヘモグロビン血液代替物の用量レベルを限定する。一般的にCOPが上昇すると静水圧が低下し、同時に糸球体濾過速度が低下し、乏尿症、そして重症の場合には無尿症となる。先行技術に記載された可溶性ヘモグロビンの投与は、徐脈、血圧上昇そしてクレアチニンクリアランスの低下を引き起こした。血管収縮と細管閉塞が、腎作用の原因であると示唆されており、これはすべて血液代替物としての可溶性ヘモグロビンの使用に結びつけられている。本明細書中に記載したように調製した、高度に重合体化したヘモグロビンは、血液代替物として使用される時、これらの問題を緩和するかも知れない。

高度にフッ素化された化合物そして特に過フッ化炭化水素化合物は、酸素に対するその高い可溶性のために、赤血球代替物として考えられている。そのような応用に有用な高度にフッ素化した化合物には、過フッ化炭化水素（例えば、パーフルオロデカリン(perfluorodecalin)、パーフルオロインダン、パーフルオロメチルアダマンタン、パーフルオロトリプロピルアミン、パーフルオロトリブチルアミン、パーフルオロオクチルプロミドなど)がある。静脈注射使用のためには、水と混ざらないこれらの過フッ化炭化水素は分散させて注射可能なエマルジ

(33)

特表平8-507075

ョンとしなければならない。これらの用途に典型的に使用される乳化剤は、卵黄レシチンや卵リン脂質があり、これらはいずれもアレルギー反応を鎮める可能性がある。

る。例えば、PCT92/06517（フッ素化合物と界面活性剤としてリソホスファチジルコリンやリソホスファチジルエタノールアミンのようなリン脂質を含有するエマルジョンを記載している）、またはPCT93/11868（これは、乳化剤として卵黄レシチンを有する、酸素運搬体として、高度にフッ化された、クロロ置換された、非環状有機化合物を含有するエマルジョンを記載している）を参照。

パーフルオロデカリンとパーフルオロトリプロピルアミンのエマルジョンである、フルオゾルーDA（Fluosol-DA）（アルファセラピューティクス（Alpha Therapeutics））は、バルーン冠動脈血管形成術の一過性虚血の治療における使用について、FDAにより認可されている唯一の製品である。別の過フッ化炭化水素製品のオキシジェント（Ocygent）（アライアンスファーマシューチカルズ（Alliance Pharmaceuticals））またはパーフルオロオクチルプロミドは、経口造影剤として認可されている。血液代替物としての過フッ化炭化水素化合物の総説については、リエス（Riess）ら、Angew Chem. Int. Ed. Engl., 17巻：621-634（1978）を参照。

先行技術に記載された血液代替物は、可溶性ヘモグロビンのみを酸素運搬体として考えている。不溶性ヘモグロビン分子（例えば、他のヘモグロビン分子により、不溶性になるほど過剰に重合しているかまたは架橋している、または過剰に変性しているため不溶性であるなど）は、分子内の酸素結合部位を破壊する可能性が高いため、酸素の可逆的結合の候補ではないことは、従来から認められている。さらに、先行技術の可溶性ヘモグロビンは、修飾していない本来のヘモグロビンのヒル係数よりは小さいヒル係数を有する。

これに対して、前述したようにヘモグロビンから調製された高分子殻は、（多数のヘモグロビン4量体分子の重合または架橋により）「巨大な」肉眼的分子であり、これはそのサイズのために水性媒体には不溶性である。超音波照射中に、

(34)

特表平8-507075

蛋白のシステイン残基上のスルフヒドリル基の架橋の結果として重合が起きる。本発明に従って調製される高分子殻は、典型的には少なくとも $10^4$ 個の架橋重合分子よりなり、ヘモグロビンの1つの肉眼的「メガマー」(megamer)には、 $12^{12}$ 個ものヘモグロビン4量体が架橋することができる。これらの不溶性作成

体に対して酸素は、赤血球代替物の有効な範囲である親和力(すなわち、 $P_{50}$ は約10 mmHg～約50 mmHg)で、結合することができることが予想外に発見された。

本発明の不溶性ヘモグロビン作成体(IHC)に関する別の驚くべきかつ予想外の観察は、その驚くほど高いヒル係数( $n$ )である。ヒル係数は、ヘモグロビン4量体分子内の酸素結合部位(ヘムユニット)間の協働作用の尺度である。未変性のヘモグロビンの最大のヒル係数は約2.8であり、先行技術の修飾ヘモグロビンについて典型的に報告されているヒル係数は2.8未満である。本発明の不溶性ヘモグロビン作成体の測定されたヒル係数はきわめて大きく、典型的には約5～約25の範囲である。いかなる理論に拘束されるつもりはないが、これらの驚くほど高い値は、隣接する架橋した4量体のヘモグロビンユニットの酸素結合部位間の相互作用またはコミュニケーションが原因かも知れない。基本的に、大きいヒル係数は、酸素に結合すると不溶性作成体中でデオキシ-T(緊張)状態からオキシ-R(弛緩)状態へのスイッチングに、複数の4量体が協働していることを示していると考えられている。

本発明のヘモグロビン作成体で観察されたこの予想外に大きいヒル係数は、ヘモグロビンの4量体単位当たりに運搬される酸素の量は、未変性のヘモグロビンや先行技術の修飾ヘモグロビンで達成される量よりはるかに多いという利点を有する。この増加した酸素運搬能力は、赤血球代替物としての本発明の利用に対して非常に有利である。

本発明のヘモグロビン作成体のヒル係数は、酸素の分圧が約40～100 mmHgの範囲で最大になる。すなわち、この酸素圧の範囲で最大の協働作用が行われる。典型的な肺泡 $pO_2$ はこの範囲内にあり、本発明の作成体が血液代替物として使用される時、ヘモグロビン作成体による肺からの酸素摂取は最大になるであろう。

(35)

特表平8-507075

一方、本発明の作成体による組織への酸素の放出は生理的条件と非常によく似ており、すなわち典型的な組織  $pO_2$  ( $< 40$  mmHg) で、不溶性ヘモグロビン作成体に結合した酸素の大部分は、組織の酸素化のために放出される。すなわち、本発明の架橋した不溶性ヘモグロビンは、組織中の典型的な圧力で酸素を効率的に放出する能力を維持しながら、典型的な負荷圧力（例えば、肺の中）で先行技術のヘモグロビンより高い能力（大きいヒル係数）で酸素に結合する優れた能力を有する。

本発明の不溶性ヘモグロビン作成体は、その架橋性とサイズのために、先行技術に赤血球（RBC）代替物よりもインビボの循環時間がかなり長くなりやすい。さらに、その大きな分子（肉眼的）サイズのため、これらは先行技術で記載された通常の4量体またはオリゴマー可溶性型のヘモグロビンに一般的な、腎毒性を誘発し易い。

本発明の中空（「泡様」または微泡（microbubble））の不溶性ヘモグロビン作成体では、ヘモグロビン殻または膜内に適当なガスを充填してもよい。すなわち、例えば外部装置または肺の内部のように、ヘモグロビン「微泡」が酸素と平衡化されると、作成体すなわち泡の中心殻は非結合酸素すなわち遊離の酸素で飽和され、これが分子拡散により殻内に入る。従ってこの作成体は、微泡殻または膜を形成するヘモグロビンに結合した酸素以外に、その中空の殻貯蔵部内で非結合の酸素を運搬する。この非結合の（しかし、捕捉されている）酸素を運ぶ能力は、ヘモグロビンのみが酸素を運搬するよりも、はるかにこの系の酸素運搬能力が向上する。ヘモグロビンに結合した酸素以外に、非結合の分子状酸素の貯蔵部を運ぶ能力を有する先行技術はない。

冠動脈血管形成術またはガン治療のように短時間の使用で最大の酸素送達のため、不溶性ヘモグロビン作成体はまた、血管内投与の前に酸素をあらかじめ負荷または飽和させてもよい。

インビボの赤血球と異なり、その分離された「細胞様」の性質により、本発明の不溶性ヘモグロビン作成体は、生理的な方法で酸素を運搬することができる。



(36)

特表平8-507075

その「メガマー」性のために本発明の不溶性ヘモグロビン作成体は、先行技術の任意の可溶性ヘモグロビンの同程度の量（酸素運搬能力の観点から）に比較すると、無視できる程のコロイド性浸透圧を有する。このため、高濃度の本発明のヘモグロビン作成体の静脈内注入が可能になり、一方先行技術の可溶性ヘモグロビンでは、浸透圧勾配のために血管スペースのまわりの組織から多量の水分が失われることが懸念されるため、注入の最大濃度はわずか6～8 g/dlである。

本発明は、赤血球代替物として他の酸素結合蛋白を使用することも可能にする。1例として、1つの酸素結合ヘム基（架橋可能なシステイン残基は持たない）を

有する蛋白のミオグロビンは、同様に挙動することが予測される。不溶性ミオグロビン作成体を作成するために、少なくとも2つの架橋可能なシステイン残基を有する、遺伝子操作で作成したミオグロビンが使用できる。本発明の不溶性作成体を作成するのに、酸素に対して親和性を持たない蛋白を酸素結合蛋白と組合せてもよい、例えば、ヘモグロビンとアルブミンを使用することができる。

本発明の組成物は、先行技術のカプセル化したヘモグロビン組成物に対して、有意な利点を有する。先行技術のリボソームヘモグロビン製剤は、外部の脂質層内の可溶性ヘモグロビンよりなる。先行技術のリボソームでカプセル化したヘモグロビン組成物は、本発明により克服されるいくつかの欠点を有する。リボソーム組成物からの可溶性ヘモグロビンの漏出は、腎毒性を引き起こす可能性がある。本発明の不溶性作成体は、広範に架橋しているため、可溶性ヘモグロビンが漏出することはない。リボソームの凝集は、補体蛋白C3aを活性化することが知られている。不溶性作成体はリボソームのサイズの範囲よりかなり大きいいため、この凝集は起こりにくい。

不溶性の架橋したヘモグロビンの本発明の組成物は、先行技術の可溶性ヘモグロビンに関連した毒性を避けている。ヘモグロビンの腎毒性は、主に循環系からの可溶性2量体、4量体またはオリゴマーヘモグロビンのクリアランスに関連している。本発明のヘモグロビンは広範に架橋しており、すなわち「巨大」であるため、腎臓から除去されず、腎毒性を引き起こしにくい。本発明の不溶性作成体

(37)

特表平8-507075

は腎臓から除去されず、従ってこの問題はない。本発明の広範に架橋したヘモグロビン作成体の先行技術に対するさらなる利点は、その不溶性の型のため血管内での保持が増加していることである。

不溶性ヘモグロビン作成体(IHC)の形態を、走査電子顕微鏡(TEM)を用いて測定した。ウシのIHCの断面切片のTEM顕微鏡写真を得るために、IHCをグルタルアルデヒドで固定し、(蛋白濃度の高い領域でコントラストをよくするため)4酸化オスミウムとフェリシアン化カリウムで染色し、低粘土樹脂で包埋し、ミクロトーム切片(切片の厚さ、約75nm)を作成した。この処理の間にIHCのある程度の収縮と形のひずみが予測されるため、IHCの真の直径は、溶液粒子サイズ分布により求めるのが最も良い(3ミクロン、標準偏差1)。

TEM顕微鏡写真を詳細に観察すると、3つの明瞭な領域が見える(中心部の鮮明な領域;粒子のまわりの黒く薄い層;そして、粒子の外表面に接したゆるく結合した、拡散した灰色の斑点状の領域)。この黒く薄い層はIHC殻である。これは高密度の蛋白を含有し、染色処理で最も強いコントラストを示す。ゆるく結合した灰色の物質は、試料調製の固定処理中に、IHC殻に付着する未変性の蛋白のようである。この写真および他の多くの写真からの最初の測定から、ウシヘモグロビンIHCの殻の厚さは約25~35nmである。ヘモグロビンは、直径5.5nmの大体球状の蛋白である(ストライヤー(L. Styer)、Biochemistry、フリーマン(W. H. Freeman)、ニューヨーク、1988)。従って、IHCの蛋白殻は、約4~20ヘモグロビン分子分(4量体)の厚さである。すなわち、直径3.0ミクロンの泡は、約 $10^4 \sim 10^{12}$ 個のヘモグロビン分子を含有するであろう。

円偏光二色性(circular dichroism)により本発明の不溶性ヘモグロビン作成体(微泡または微小球)を検査すると、 $\alpha$ らせんおよび $\beta$ らせんシートの含量は、精製された間質のないヘモグロビン(SFH)の含量と有意な差はなかった。これは、不溶性ヘモグロビンの架橋法や作成が蛋白の変性(すなわち、3次構造および4次構造の変化)を起こすことはないことを示すため、この観察は重要で

(38)

特表平8-507075

ある。この観察は、合成工程後の可逆的酸素結合の保持と、酸素結合ヘムユニット間の協力を示す機能データにより確認された。

IHCの酸素結合性について測定した。met-Fe(III)型のヘモグロビン、酸素に結合できないため、Fe(III)をFe(II)に還元するのにヒヤシ(Hyashi)らの還元系を使用した(ヒヤシ、スズキ、シン(A. Hyashi, T. Suzuki, M. Shin)、Biochem. Biophys. Acta、310:309、1973)。この還元系は、種々の濃度のグルコース-6-リン酸、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、NADP、フェレドキシン、フェレドキシンリダクターゼおよびカタラーゼよりなる。各酸素結合実験の前に、IHCに還元系を添加し、4℃で24~36時間維持した。

実施例14に記載したように、ウシおよびヒトヘモグロビンIHCを合成した。当業者には理解できるように、使用するヘモグロビンは任意の脊椎動物、非脊椎動物または真核細胞から得られるか、または脊椎動物、非脊椎動物または真核細胞

の遺伝子操作の生成物でもよい。表1は、この結果の要約である。

表1  
種々の濃度のリン酸塩中の超音波処理したHb微泡と  
超音波処理していないBhbのn<sub>max</sub>とP<sub>50</sub>の要約

エフエクター濃度 (mM)	超音波処理したHb微			超音波処理していないHb溶液		
	1HP n <sub>max</sub>	P <sub>1/2</sub>	2, 3-BPG n <sub>max</sub>	1HP n <sub>max</sub>	P <sub>1/2</sub>	2, 3-BPG n <sub>max</sub>
0	9.5	21.2	9.5	2.7	22.3	2.7
0.25	12.1	22.2	11.5	2.7	24.7	2.7
0.5	15.2	28.3	13.0	2.8	28.2	2.8
1.0	15.1	32.1	13.4	2.8	30.2	2.8
1.7	17.6	39.5	14.0	2.8	34.1	2.8

注: Bhb微泡のヒル係数は右記の式から計算される: 
$$n = \frac{\Delta \log(Y/(1-Y))}{\Delta \log P_{O_2}}$$

ここでYは酸素化された割合であり、P<sub>O2</sub>は酸素の圧力である。  
各微泡について、各Δlog(Y/(1-Y))項は5つの連続した点を平均してある。

すべての結合実験は、トリス緩衝液 (pH7.4) で25℃で行った。IHCは可逆的に酸素に結合する能力を保持しており、これは、met-Fe(III)、オキシ-Fe(II)およびデオキシ-Fe(III)型の存在を示す、IHCのUVスペクトルにより証明された。IHCはデオキシ状態とオキシ状態の間のサイクルを10回以上繰り返しても、実質的な劣化は起きない。これは、IHC赤血

(40)

特表平8-507075

球代替物の作成の過程で、活性ヘム部位の周囲の環境は有意に変化していないことを示しており、重要である。

これらの酸素結合データは、IHCは実質的に非変性ヘモグロビンよりなることを示唆している。これが変性した場合は、生理学的反応はまったく（またはほとんど）起きないであろう。

リン酸塩の非存在下での還元ヘモグロビンIHCと未変性の間質のないヘモグロビンの酸素結合曲線はシグモイド形であり、酸素結合の協働作業を示している。P<sub>50</sub>値（ヘモグロビン上の結合可能な部位の半分が酸素に結合している時の圧力）は両方の曲線で同様である（21 Torrと22 Torr）。この結果はIHCが未変性のヘモグロビンと同様の酸素圧で、酸素を結合したり放出したりすることを示している。驚くべきことに、IHCの最大ヒル係数（酸素結合部位間の協働作用のレベルを示す）は間質のないヘモグロビン溶液より有意に高い（9.5対2.6、図2を参照）。ヒル係数は以下の式を用いて計算された：

$$\frac{\Delta \log (Y / 1 - Y)}{\Delta \log P_{O_2}}$$

ここで、Y = 酸素化された割合、そして

P<sub>O<sub>2</sub></sub> = 酸素分圧

各（ $\Delta \log (Y / 1 - Y)$ ）項を、5つの連続した点について平均することにより、平滑化を行った。

イノシトールヘキサホスフェート（IHP）や2,3-ジホスホグリセレート（2,3-DPG）は、P<sub>50</sub>を上昇させ（すなわち、酸素親和性は低い）協働作用を増進させることが証明されている。IHCでも同じ作用が見られる。P<sub>50</sub>値は同程度に上昇するが、IHCの協働作用ではさらに劇的な現象が見られる。

n<sub>max</sub>は、1.7 mMのIHP（17.6対2.8）と2,3-DPG（14対2

8）の存在下で未変性のヘモグロビンに対して劇的に上昇した（図3と表1を参照）。

この協働作用における予想外に大きな上昇は、ヘモグロビン4量体とIHC殻

(41)

特表平8-507075

との間の共有結合によるものである。ヒル係数は、相互作用結合部位の数より大きくなることはできない。未変性のヘモグロビンの約2.8という値は、1つの4量体での協働作用を示している。しかし、IHC殻の場合は酸素に結合すると、いくつかの架橋4量体（ジスルフィド結合の形成により）の間でコミュニケーションがある。最も近い4量体との相互作用が最も強くなりやすいが、それより遠いところの4量体とも弱い相互作用が存在する。基本的に $n_{a,r}$ が大きいということは、酸素に結合したときIHC殻内でデオキシ-Tからオキシ-R状態へのスイッチングに複数の4量体が協働作用をしていることを示している。また、ヘモグロビンIHCのTEM顕微鏡写真は、約6つのヘモグロビン4量体の殻の厚さを示している。直径3.0ミクロンの泡は、約 $10^4 \sim 10^{12}$ 個のヘモグロビン分子を含有するであろう。

調製後種々の時間間隔で粒子計測により、IHCの保存安定性を試験した。IHCを、無菌生理食塩水中で4℃で6カ月まで保存した。3カ月目にIHCの濃度は約10%低下し、6カ月目には濃度は約25~30%低下した。

IHCの（オキシ-Fe(II)からmet-Fe(III)への）自己酸化は、37℃、25℃、4℃で、それぞれ60時間、96時間、25日間であると測定された。これらの結果が得られた時、不活性雰囲気を保つために特に注意は払わなかった。先行技術は、ヘモグロビンの自己酸化の速度を低下させるのに、窒素のような不活性雰囲気を維持することの利点を明瞭に示している。そのような条件下での保存は、長時間維持できるFe(II)の割合を大幅に増加させるであろう。

さらに、前述のヒヤシ（Hyashi）らの還元系を用いてIHC懸濁物を保存することにより、自己酸化は防止できるであろう。

IHC懸濁物の最終段階の滅菌法として低温殺菌法を試験した。いくつかの異なる低温殺菌条件を使用した。IHCに対する温度の悪影響を測定するために、各条件の後に粒子数の計測を行った。

条件1：IHC懸濁物の温度は8分間で25から62.8℃への勾配をつけ、こ

の温度で30分間維持した。粒子数は、劣化が20%未満であることを示してい

(42)

特表平8-507075

た。

条件2: IHC懸濁物の温度は10分間で25から71.7℃への勾配をつけ、この温度で15秒間維持した。粒子数は、劣化が20%未満であることを示していた。

条件3: IHC懸濁物の温度は12分間で25から89.5℃への勾配をつけ、この温度で2秒間維持した。粒子数は、劣化が70%以上であることを示していた。

従って、低温殺菌方法として、条件1と2が適切であった。最終段階の滅菌法としてガンマ線照射も適している。

IHCの酸素親和性(または $P_{50}$ )は、公知のアロステリックエフェクターによるヘモグロビンの化学的修飾により変化させることができる。一般的にヘモグロビンの修飾は、オキシとデオキシの2つの高次構造の間の移行を制限するため、酸素化機能はほとんどいつもいくぶんかは変化する。例えばヘモグロビンがオキシ型で変化する時は、通常高酸素親和性が好ましいが、デオキシ条件で修飾される場合はその逆が真である。ビリドキサールの誘導体は、天然のアロステリックエフェクターである2,3-ジホスホグリセレート(DPG)に似ているため、有用な修飾物質である。これらはヘモグロビンの末端アミノ基に結合する。例えば、天然の2,3-DPGとの相互作用に似た反応をするビリドキサル5'-リン酸とヘモグロビンを反応させて、 $P_{50}$ を上昇させる。2-ノル-2-ホルミルPLP(ヘモグロビン $\beta$ 鎖に結合する2官能基性物質)、またはビス-ビリドキサル4リン酸のような、他のビリドキサールの誘導体も有用な修飾物質である。アシルトリス(メチルリン酸ナトリウム)のような他の架橋剤も、 $\beta$ 鎖の架橋に使用することができる。

アルデヒド修飾物質も使用される。例えば、ヘモグロビンの重合にはグルタルアルデヒドが有用であり、PLPと共同して使用される。

3,5-ビス(ジブロモサリチル)フマレートのようなジアスピリンエステルや対応するモノアスピリンは、有用なアロステリック修飾物質である。このアスピリンはヘモグロビンの $\alpha$ 鎖の間に結合し、内部リジンの1官能基性試薬である。

(43)

特表平8-507075

いずれの試薬もヘモグロビンの $P_{50}$ を増加させる。

外傷や急性の血液喪失以外の状況（例えば、酸素の局所送達が必要であって有利である時）で使用するために、「低親和性」または「高親和性」作成体が調製される。

前述の方法で産生される「低親和性」作成体（すなわち、大きい $P_{50}$ （ $> 28$  mmHg））は、ガンの放射線療法や化学療法においてアジュバントとしての酸素の利用において使用される。そのような作成体は、体外で最大の酸素容量まで負荷させて、次にガンの循環系に投与される。これは、ガンの部位で多量の酸素の放出を可能にする。放射線療法や化学療法の実施下で産生される活性化酸素は、ガンの部位でより強い細胞毒性活性を示す。

「高親和性」作成体（ $P_{50} < 28$  mmHg）は、「虚血性酸素送達」において使用される。虚血（すなわち、組織の酸素欠乏）は、多くの疾患（例えば、脳卒中、心筋梗塞など）で起きる。そのような場所で酸素が優先的に放出されれば、永久的な組織傷害を最少にするのに役立つであろう。全血に近い酸素親和性を有する酸素運搬体または赤血球代替物は、そのような部位で優先的に酸素を放出することはない。しかし、高い酸素親和性（すなわち、全血に比較して小さい $P_{50}$ ）を有するものは、通常遭遇する酸素濃度勾配条件下で酸素の大部分を保持しながら、血液と組織の間の大きな酸素濃度勾配により、そのような虚血部位で酸素を優先的に放出するであろう。本発明の不溶性ヘモグロビン作成体の親和性は、架橋の性質を変化させることにより、目的の親和性を有する適切な天然のヘモグロビンを使用することにより、または適切な親和性を有する遺伝子操作で作成したヘモグロビンを使用することにより、そのような応用に適した値（ $P_{50}$ ）に容易に変化させることができる。

本発明の不溶性ヘモグロビン作成体は、酸素運搬体（例えば、過フッ化炭化水素）、薬剤、診断薬などの薬理活性物質をカプセル化することができ、従ってその有効な運搬体として作用することができる。カプセル化された過フッ化炭化水素（FC）は、有効な酸素運搬体であり、酸素の分圧に対して直線関係で溶存酸素を運搬および放出し、IHCのヘモグロビン殻は、酸素分圧に対してシグモイド関係で、結合酸素を運搬し放出する。同じ製剤内のこのヘモグロビンと過フッ



(44)

特表平8-507075

化炭化水素のユニークな組合せは、インビボでの酸素の最大の運搬と放出を可能にする。

先行技術ではヘモグロビンと過フッ化カーボン (FC) を同時に送達する能力は記載されていない。ヘモグロビン殻内のカプセル化された過フッ化カーボンは、酸素貯蔵器として作用することができる。この組合せは、圧力とシグモイド関係 (すなわち、ヘモグロビンに対して) および圧力と直線関係 (すなわち、過フッ化炭化水素に対して) で、運搬体に結合した酸素の送達を可能にする。この組合せは、組織  $pO_2$  に関して直線関係 (過フッ化炭化水素から) 酸素の「バックグラウンド」放出と、組織  $pO_2$  に関して (ヘモグロビンから) シグモイド式に酸素の「瞬時的」 (bolus) 放出を可能にする。このため、特に短期間に大量の酸素が送達されるべき状況 (例えば、組織虚血またはガンの治療) で、さらに効率的な酸素の送達が可能になる。

この Hb / FC 組合せは、血管内に送達された容量の位置推定に関して、外部モニタリングという追加の利点を有する。<sup>19</sup>F 核は磁気共鳴画像法 (MRI) により容易にイメージングができるため、血管や組織内の送達された懸濁物の蓄積を追跡することが可能である。これは、目的部位への酸素運搬ヘモグロビン / FC 懸濁物の送達を正確に追跡するために、酸素が放射線療法や化学療法の付加物として使用される、ガン治療において大きな利点を有する。

いくつかの過フッ化炭化水素 (FC) は、以下に詳述するように本発明の実施での使用に適している。

さらに、酸素結合能力はないがシステイン残基またはスルフヒドリル基 (本来のものまたは人工的に導入したもの) を有する蛋白は、血液代替物として使用するのための、適切な酸素親和性を有する生体適合性過フッ化炭化水素をカプセル化するのに使用される。例としてアルブミンは、血液代替物として使用するのためのパーフルオロデカリンまたはパーフルオロトリプロピルアミンをカプセル化するのに使用することができる。

いくつかの薬剤は、本発明のヘモグロビン微小球中にカプセル化される候補である。ガンに対する最大の細胞毒性を示すために酸素の存在を必要とする化学療法薬剤がいくつかある。ヘモグロビンのような酸素運搬体の作成体内へのそのよ

(45)

特表平8-507075

うな薬剤の送達は、1つのパッケージ内に細胞毒性の基本的に必要な成分を有効に組合せている。有用な細胞毒性のいくつかは脂溶性である。これらの薬剤は、過フッ化炭化水素や、大豆油、ベニハナ油、ココナツ油、オリーブ油、綿実油などの生体適合性油中に溶解される。架橋した不溶性ヘモグロビンの殻内に、油／薬剤の微小球を産生するために、油／薬剤溶液は超音波照射される。この懸濁物は血管内投与の前に酸素化してもよい。脂溶性薬剤には、シクロホスファミド、BCNU、メルファラン、ミトマイシン、タキソール (taxol) と誘導体、タキソテレ (taxotere) と誘導体、カンプトテシン、アドリアマイシン、エトポシド、タモキシフェン、ビンブラスチン、ビンクリスチンなど；イブプロフェン、アスピリン、ピロキシカムなどの非ステロイド性抗炎症薬；エストロゲン、プレドニソロン、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、ジフロラソンなどのステロイド、フェネステリン、ミトタン、ビスジン、ハロニトロソ尿素、アントロサイクリン、エリブチシン、ジアゼパムなどの薬剤；サイクロスポリン、アザチオプリン、FK506などの免疫抑制剤がある。

水溶性薬剤はまた、2重乳化法によりIHC殻内にカプセル化される。まず、薬剤水溶液を生体適合性油で乳化して、油注水 (W/O) エマルジョンを得る。このW/Oを油相として処理して、前述のようにヘモグロビン水溶液で超音波照射して、目的の水溶性薬剤の微小エマルジョンを殻内に含有するIHCを得る。本発明の実施態様において使用される乳化剤には、プルロニクス (Pluronics) (ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロックコポリマー)、卵黄由来のリン脂質 (例えば、卵黄リン脂質、卵黄レシチンなど)；脂肪酸エステル (例えば、グリセロールモノおよびジステアリン酸、グリセロールモノおよびジパルミチン酸など) がある。本発明の実施態様において使用される水溶性薬剤には、アクチノマイシン、ブレオマイシン、シクロホスファミド、デュアノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、フルオロウラシル、カルボプラチン、シスプラチン、インターフェロン、インターロイキン、メソトレキセート、マイトマイシン、タモキシフェン、エストロゲン、プロゲステロンなどの抗新生物剤がある。

2重エマルジョン法はまた、治療的価値、診断的価値または栄養価のある他の

(46)

特表平8-507075

水溶性物質の送達に適している。例えば、IHCのヘモグロビン含量は、IHC内にヘモグロビン微小エマルジョンをカプセル化ことにより増加させることができる。

IHCをさらに赤血球に似させるために、架橋したヘモグロビン微泡のまわりにリン脂質2重層を形成させることができる。そのような2重層により真の「赤血球類似体」ができ、これは2工程法で作成することができる。この2重層の作成に使用される荷電リン脂質または脂質には、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、ジミリストイルホスファチジン酸、ジバルミトイルホスファチジン酸、サルコシネート（サルコシナミド）、ベタイン、モノマーおよびダイマーアルキドなどがある。本発明では非陰イオン性脂質もまた使用され、ポリエチレン脂肪酸エステル、ポリエチレン脂肪酸エーテル、ジエタノールアミン、長鎖アシルヘキソサミド、長鎖アシルアミノ酸アミド、長鎖アミノ酸アミン、ポリオキシエチレンソルビタンエステル、ポリオキシグリセロールモノーおよびジーオレイン酸、グリセロールモノーおよびジバルミチン酸などがある。

本法のもう1つの変法は、さらに安定な脂質「膜」殻を得るために、化学反応により容易に架橋される光重合性脂質を用いることである。本発明に使用される光重合性脂質には、アクリル酸またはメタクリル酸置換脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ジミリストイルホスファチジン酸、ジバルミトイルホスファチジン酸など）；本来の重合性不飽和を有する脂質（ジアセチレン基または共役ジエン基を有するホスファチジルコリンなど）などがある。チオールジスルフィド結合交換により容易に架橋される脂質も、IHCの安定な脂質殻の形成の良好な候補である。そのような脂質の例には、リボ酸でエステル化されたホスファチジルコリンの誘導体などがある。

超音波照射により合成されたIHCは、前述のように生体適合性媒体および他の栄養価のある物質中の懸濁物として投与することができる。

インビボ投与の好適な経路は、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、腹腔内、経口

(47)

特表平8-507075

吸入、局所、経皮、坐剤、ベッサリー投与などがある。

要約すると、本発明の不溶性ヘモグロビン作成体は、先行技術の可溶性ヘモグロビン、先行技術のカプセル化可溶性ヘモグロビン、および先行技術の過フッ化炭化水素血液代替物または酸素運搬体に対して多くの利点を有する。これらの利点には、以下のようなものがある：

- ・ 酸素容量が高い、
- ・ 酸素親和性が変更できる、
- ・ 先行技術の4量体またはオリゴマー可溶性ヘモグロビンよりも循環系中で長く維持される、不溶性「巨大」ヘモグロビンである、
- ・ 分子サイズが大きいため、腎毒性の可能性が低い、
- ・ リボソームカプセル化ヘモグロビンの場合よりヘモグロビンが漏出しにくい、
- ・ リボソームよりサイズがはるかに大きいため、補体蛋白を活性化する凝集物が生成しにくい、
- ・ 先行技術の可溶性ヘモグロビンに比較して、分離した「細胞」のような性質から赤血球のように挙動する、
- ・ ヘモグロビンに結合した酸素とともに非結合の酸素の受容器を運搬することができる、
- ・ アレルギー性の乳化剤や毒性乳化剤のない、過フッ化炭化水素（FC）運搬体として使用できる、
- ・ Hb／FC作成体中の架橋したヘモグロビンであるため、卵黄リン脂質および／または他の合成界面活性剤を用いる先行技術の乳化系に比較して安定性が向上している、
- ・ Hb／FCからの酸素放出プルフィールは、組織 $pO_2$ に対してシグモイドと直線の組合せである、
- ・ Hb／FC作成体は、 $^{19}F$  MRIにより検出およびモニタリングができる、
- ・ ヘモグロビンまたはHb／FC作成体は、酸素を運搬する以外に薬剤運搬体として使用される、

(48)

特表平8-507075

・より生理的な状態に近づけるため、ヘモグロビン作成体に脂質2重層膜が適用される、

・血管内の持続性を向上させるために、ヘモグロビン作成体はPEGのようなポリマーで修飾される。

本発明の別の面において、一般的に疎水性であり、水と混ざりあわずそして投与が難しい有機フッ素含有化合物を、高分子殻中に捕捉して送達を容易にすることができる（前述）ことが見いだされた。高分子殻中に捕捉される有機フッ素含有化合物は、すぐ使用でき生体適合性がある。本発明により産生される高分子殻の粒子サイズは、平均直径が約2ミクロンであり、これは小血管を詰まらせて組織障害（例えば、酸素欠乏起因する虚血により引き起こされる）を起こす危険なして静脈内または動脈内注入が可能なため、理想的である。比較のため、赤血球は直径約8ミクロンである（従って血管の閉塞を防ぐため、注入される生体適合性物質は直径8～10ミクロン以下でなければならない）。

天然に存在するフッ素原子（ $^{19}\text{F}$ ）は明瞭な核磁気共鳴シグナルを与え、従ってMRIにおける造影剤または「プローブ」として機能する。 $^{19}\text{F}$ 使用の具体的利点は、以下のようなものである：1）体内の本来の濃度は極めて低い（通常フッ素は体内には存在しない）、2）核磁気共鳴感度が高い、3）磁気回転比が $^1\text{H}$ に近い、ため、既存のMRI装置のわずかな変更で $^{19}\text{F}$ 磁気共鳴画像法を実施することができる、そして4）ほとんどの有機フッ素含有化合物の毒性は低い。

一般的に過フッ化炭化水素は非毒性であり、生体適合性である。過フッ化炭化水素は安定で非反応性であり、従ってその強い炭素-フッ素結合（約130キロカロリー/モル）は代謝されにくい。比較のために、炭素-水素結合（約100キロカロリー/モル）はもっと弱く反応性が高い。FDAは、2つの過フッ化炭化水素（パーフルオロトリプロピルアミンとパーフルオロデカリン）を商品名フルオゾルDAで、血液代替物として薬剤用途に認可している。

本発明の実施には、多くの異なる過フッ化炭化水素が使用できる。例えば、以下の一般式を満足する化合物：

(a)  $\text{C}_x\text{F}_{2x+y-z}\text{A}_z$ 、式中、

(49)

特表平8-507075

$x = 1 \sim 30$ 、好ましくは  $5 \sim 15$  であり、

$y = 2$ ；または  $x \geq 2$  の時、 $0$  または  $-2$ ；または  $x \geq 4$  の時、 $-4$  であり、

$z = 0$  から  $(2x + y - 1)$  までの任意の整数であり、そして

A は、H、F 以外のハロゲン、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}$ （ここで、R は H、アルキル、フルオロアルキル、アルケニル、フルオロアルケニル、アルキニル、フルオロアルキニル、アリール、フルオロアリール、アルカノイル、フルオロアルカノイル、アルケノイル、フルオロアルケノイル、アルキノイル、フルオロアルキノイルである）から選択される、

(b)  $[\text{C}_x \text{F}_{2x+y'-z} \text{A}_z]_a \text{J R}_{b-a}$ 、式中、

$x$ 、 $z$ 、A および R は上記と同義であり、

$y' = +1$ ；または  $x \geq 2$  の時、 $-1$  または  $-3$ ；または  $x \geq 4$  の時、 $-5$  であり、

J = O、S、N、P、Al または Si であり、

$a = 1$ 、 $2$ 、 $3$  または  $4$  であり、そして

$b = 2$ （2 価の J の場合）であるか、または

3（3 価の J の場合）、

4（4 価の J の場合）であり、

(c)  $\text{A}' - [(\text{CF}_2)_x - \text{O}]_c - \text{A}''$ 、式中、

$x$  は上記と同義であり、

A' は、H、ハロゲン、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OR}$ （ここで、R は H、アルキル、フルオロアルキル、アルケニル、フルオロアルケニル、アルキニル、フルオロアルキニル、アリール、フルオロアリール、アルカノイル、フルオロアルカノイル、アルケノイル、フルオロアルケノイル、アルキノイル、フルオロアルキノイルである）から選択され、

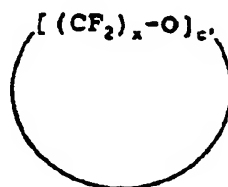
A'' は、H または R（ここで R は上記と同義である）から選択され、

$c = 1 \sim 200$ 、好ましくは  $2 \sim 50$  であり、または

(50)

特表平8-507075

(d)



式中、

$x$  は上記と同義であり、そして

$c' = 2 \sim 20$ 、好ましくは  $2 \sim 8$  である、

およびこれらの任意の2つ以上の混合物は、本発明の方法を用いて高分子殻中に導入することができる。

上記の一般式に含まれるのは、一般式：

$C_xF_{2x}$ 、例えば、パーフルオロ-1-ヘキセン ( $C_6F_{12}$ )、パーフルオロ-2-ヘキセン ( $C_6F_{12}$ )、パーフルオロ-3-ヘキセン ( $C_6F_{12}$ ) など、

シクロ- $C_xF_{2x}$ 、例えば、パーフルオロシクロヘキサン ( $C_6F_{12}$ )、パーフルオロシクロオクタン ( $C_8F_{16}$ ) など、

$C_xF_{2x-2}$ 、例えば、パーフルオロ-1-ヘキシシ ( $C_6F_{10}$ )、パーフルオロ-2-ヘキシシ ( $C_6F_{10}$ )、パーフルオロ-3-ヘキシシ ( $C_6F_{10}$ ) など、

ビシクロ- $C_xF_{2x-2}$ 、例えば、パーフルオロデカリン ( $C_{10}F_{18}$ ) など、

$C_xF_{2x+2}$ 、例えば、パーフルオロヘキサン ( $C_6F_{14}$ )、パーフルオロオクタン ( $C_8F_{18}$ )、パーフルオロノナン ( $C_9F_{20}$ )、パーフルオロデカン ( $C_{10}F_{22}$ )、パーフルオロドデカン ( $C_{12}F_{26}$ ) など、

$C_xF_{2x-4}$ 、例えば、パーフルオロ-2, 4-ヘキサジエンなど、

$C_xF_{2x+1}A$ 、例えば、パーフルオロトリプロピルアミン [ $(C_3F_7)_3N$ ]、パーフルオロトリブチルアミン [ $(C_4F_9)_3N$ ]、パーフルオロ-tert-トリブチルアミンなど、

$C_xF_{2x-2}A_2$ 、例えば、 $C_{10}F_{18}H_2$  など、

を有する化合物、および、パーフルオロインダン、パーフルオロメチルアダマンタン、パーフルオロオクチルブロミド、パーフルオロジメチルシクロオクタン、パーフルオロシクロオクチルブロミド、パーフルオロクラウンエーテルなどの、高度にフッ素化された化合物がある。

(51)

特表平8-507075

前述の直鎖、分岐鎖および環状フッ素含有化合物以外に、フッ素化クラウンエーテル（例えば、パーフルオロ12-クラウン-4、パーフルオロ15-クラウン-5、パーフルオロ18-クラウン-6など）も、本発明の実施に使用できると考えられる。

高いシグナル対ノイズ比で良好な磁気共鳴画像を得るためには、大きい数の等価のフッ素を使用することが有利である。本明細書において、「等価のフッ素」という用語は、実質的に同様な微小環境中（すなわち、実質的に同様の磁気環境）に存在するフッ素含有化合物のフッ素置換体を意味する。等価のフッ素は1つのイメージングシグナルを与える。大きい数の等価のフッ素は、「非等価」のフッ素の競合シグナルにより希釈されない、強いシグナルを与えるであろう。

本明細書において、「非等価のフッ素」という用語は、同じフッ素含有化合物上の他のフッ素置換体に比較して、実質的に同様でない微小環境中（すなわち、実質的に同様でない磁気環境）に存在するフッ素含有化合物のフッ素置換体を意味する。従って、等価のフッ素とは対照的に、非等価のフッ素は、その異なる化学シフトのために、複数のシグナルを与える。すなわち、大きい数の非等価のフッ素はMRI応用に十分であるが、そのような化合物は最良の画像を得るのには理想的ではない。

血管の造影に特に関係味があるのは、循環時間の長いフッ素含有高分子殻である。現在使用されている造影法は、X線造影剤を使用し、侵襲的方法である。最近血管造影への $^1\text{H}$ -NMRの応用の可能性が示された〔エーデルマンとワラック (Edelman & Warach)、New England J. of Medicine、328:785-791 (1993)〕。同様に $^{19}\text{F}$ -MRIは、いくつかの利点（例えば、回りに組織（これは本来のフッ素を含有していない）に関して強いコントラストを達成することができる）を有しており、血管造影に有用である。このような方法の応用としては、頭蓋内動脈瘤、動静脈奇形、上大静脈、下大静脈、腎腸間膜動脈、抹消腸間膜動脈などの閉塞の診断や同定がある。

本発明の高分子殻に捕捉されたフッ素含有化合物は、種々の目的に使用され、例えば、種々の臓器および／または組織の磁気共鳴画像を得るため、臓器および



(52)

特表平8-507075

／または組織の酸素プロフィールを得るため、そして局所温度を測定するために使用される。本発明の造影剤はMRI応用のみに限定されず、超音波検査法や放射線医学にも応用される。フッ素の別のアイソトープである $^{18}\text{F}$ は、プロトン放射線断層撮影法(PET)造影剤として使用される。すなわち、1つのフッ素含有造影剤により、PETとMRI診断の両方が実施できる。他のイメージング剤

(例えば、放射線造影剤中で使用されるテクネチウムやタリウム化合物)の捕捉も可能である。このような造影剤の2つの例は、ニューロライト(Neurolyte)やカーディオライト(cardiolite)がある。

酸素検出のための本発明の組成物の使用は、酸素のような常磁性分子種の存在下での $^{19}\text{F}$ のNMR緩和速度の劇的な変化に基づく。酸素は常磁性であるため、フッ素核と相互作用し、 $^{19}\text{F}$ の励起状態から定常状態への緩和速度を増加させる。緩和速度の変化を追跡することにより、(酸素の既知の濃度に対してMRIシグナルを較正することにより)局所領域の酸素濃度を測定することができる。

この系の新規性は、例えば、1)酸素の情報を得るためにMRIを使用すること、2) $^{19}\text{F}$  MRI(NMR)シグナルへの酸素常磁性の影響を使用すること、3)一定の保護的環境(酸素はここを透過できる)を与えるのに高分子殻を使用することなどである。

生理的温度範囲で相変化を起こす、固体であるフッ素含有化合物(例えば、高分子量化合物、またはフッ素含有化合物の組合せ)を用いることにより、MRIは局所温度を測定するのに使用することができる。固体中では液体中よりも緩和時間ははるかに長く、転移温度(すなわち、固体から液体)に達すると、緩和時間は劇的に低下する。固体から液体への相転移の時に、NMRスペクトルの劇的な変化が観察される。ある一定のフッ素含有化合物のMRIシグナルの形は、既知の温度に対して較正される。高分子殻内の高分子量フッ素含有化合物(すなわち、融点が $\geq 15^\circ\text{C}$ のフッ素含有化合物)を用いることにより、または高分子殻内のフッ素含有化合物と非フッ素化合物の組合せを用いることにより、相転移が起きる目的の温度(典型的には、約 $22\sim 55^\circ\text{C}$ の範囲)を与えるように高分子殻内部の含有量を選択することができる。殻内の過フッ化炭化水素は目的の温

(53)

特表平8-507075

度範囲で固体から液体への相転移をして、観察される緩和時間を実質的に変化させ、インビボの温度測定を可能にする。局所温度情報は、例えばガンの温熱療法中のガン患者のモニタリングに、またはガン細胞の検出（ガン細胞は正常の細胞より温度が低い）に有用である。

使用されるフッ素含有化合物は、相転移の温度範囲を決定する。従って、この技術は、単純にフッ素含有組成物の構成を変化させることにより、広範囲の温度

で利用できる。例えば、高分子殻内に捕捉された純粋なパーフルオロドデカン（ $C_{12}F_{26}$ ）は、この過フッ化炭化水素の融点（ $7.5^{\circ}C$ ）で固体から液体への相転移を受ける。しかし、この転移はシャープであり、わずかの温度情報しか得られない。より詳細な情報を得るために、例えば純粋なフッ素含有組成物に別の成分を単に加えることにより、フッ素含有組成物の融点を広範囲に広げることができる。混合物の融点の範囲は、対応する純粋な成分より低く広いことは、当該分野で公知である。従って、例えば低分子量過フッ化炭化水素でパーフルオロドデカンを調製することにより、カプセル化された組成物の融点の範囲を広げることができる。同様に、フッ素含有化合物（例えば、パーフルオロドデカン）とアルカン（例えばペンタン）との混合物は、捕捉された組成物の融点範囲を広げるであろう。

さらに、フッ素を化学的に添加した化学修飾した長鎖脂肪酸（例えば、ヘプタデカン酸〔 $C_{17}H_{34}O_2$ 〕、ノナデカン酸〔 $C_{19}H_{38}O_2$ 〕など）、アルコール（例えば、ノナデカノール〔 $C_{19}H_{40}O$ 〕、ドコサノール〔 $C_{22}H_{46}O$ 〕など）も、本発明の実施に使用できる。例えば、パーフルオロ-tert-ブタノール（ $t-C_4F_9-OH$ ；ピーシーアール・ケミカルズ（PCR CHEMICALS））と、前述の任意の反応性酸素含有化合物との脱水結合反応により、固体から液体への相転移を受け、9個の等価フッ素を有する分子が得られるであろう。同様に、例えばフッ素化脂肪酸とコレステロールの混合物は、純粋なフッ素化脂肪酸より融点範囲を広げ、従って局所温度測定を可能にするであろう。

この温度検出系の新規性は、例えば、1）空間的に分解された温度情報を得るためにMRIを使用すること、2）MRI（NMR）シグナルの温度依存性を利

(54)

特表平8-507075

用すること、3) 目的の温度範囲で、固体から液体への相転移を受ける過フッ化炭化水素含有組成物を使用すること、4) 媒体の一定の保護的環境を与えるのに高分子殻を使用すること、そして5) 形態情報と同時に温度情報を得ることなどである。

本発明において、フッ素含有組成物の粒子は、断面直径が約10ミクロン以下の殻内に封じ込められる(本明細書において、「ミクロン」という用語は、1ミリメートルの1000分の1の長さである)。5ミクロン未満の断面直径が好ま

しく、静脈内投与のために現在1ミクロン未満の断面直径が最も好ましい。

本発明の造影剤は、イメージングの必要に応じて種々の方法で体内スペースに導入される。例えば、水性液体懸濁物は、経口消化または坐剤により胃腸間内に入れられる(例えば、胃や胃腸間の画像を得るため)か、注射器で脳脊髄腔のようなスペースに挿入されるか、または血管系一般にまたは冠動脈のような特定の臓器の血管内に注入される。さらに、本発明の造影剤は、前方眼スペース、後方眼スペース、耳、膀胱(例えば、尿道経由で)、腹腔、尿管、尿道、腎盂、骨の関節スペース、リンパ管、蜘蛛膜下、心室腔などに注入することもできる。

固体または液体のフッ素含有組成物を含有する高分子殻は、比較的少量で高用量のフッ素含有組成物物質の管理された送達が可能である。これは、大量の液体を受ける患者の不快感を最少にする。

本発明の実施態様において、文献に記載されていないタキソール(taxol)のような実質的に水不溶性の薬剤の投与の問題に対するアプローチが与えられる。すなわち、そのような薬剤はミクロン大の粒子の水性懸濁物として、またはそのような薬剤の粒子もしくは生体適合性非水性液体に溶解した薬剤の水性懸濁物として、送達される。このアプローチはそのような薬剤を比較的高濃度で送達することを可能にし、従って乳化剤の使用が不要であり、それに関連した副作用をなくす。

本発明のさらに別の実施態様において、前述の投与方法は新規の薬剤含有組成物により促進され、該薬剤組成物においてタキソールのような実質的に水不溶性の薬剤は生体適合性液体に懸濁されており、得られた懸濁物は、断面直径が約1

(55)

特表平8-507075

0 ミクロン以下のそのような薬剤（例えば、タキソール）の粒子を含有する。約 10 ミクロン未満の目的の粒子サイズは、種々の方法（例えば、摩砕、噴霧乾燥、沈澱、超音波照射など）により達成される。

従来法で得られるタキソールのような実質的に水不溶性の薬剤の結晶サイズ（20 ミクロンより大きい）のため、そのような薬剤（例えば、タキソール）の固体粒子は、通常の生理食塩水のような担体中の懸濁物の形では送達されていない。しかし、本発明は、臓器や組織の微小循環系を閉塞させる危険なしで懸濁物の形で静脈内送達を可能にする、約 10 ミクロン未満、好ましくは約 1 ミクロン

未満に摩砕した、実質的に水不溶性の薬剤（例えば、タキソール）の粒子状懸濁物の送達を開示する。

送達される薬剤の微粒子としての性質のため、その多くは、脾臓、肝臓および肺のような網内系を有する臓器により、循環系から除去される。これは、粒子状の薬理活性物質が、体内のそのような部位にターゲティングされることを可能にする。

この実施態様で使用される生体適合性液体は、前述のものと同一である。さらに、イントラリピッド（Intralipid）（非経口栄養剤として使用される市販の脂肪乳化剤の商品名；カビビトラム社（Kabi Vitrum, Inc.）、ノースカラライナ州クレイトン（Clayton）、から販売）、ニュートラリピッド（Nutralipid）（非経口栄養剤として使用される市販の脂肪乳化剤の商品名；マクガウ社（McGaw）、カリホルニア州アーバイン（Irvine）、から販売）、リポシン（Liposin）I II（非経口栄養剤として使用される市販の脂肪乳化剤の商品名（20%の大豆油、1.2%の卵リン脂質、および2.5%のグリセロールを含有する）；アボットラボラトリーズ社（Abbott Laboratories）、イリノイ州ノースシカゴ、から販売）などが、薬剤粒子の担体として使用できる。あるいは、生体適合性液体が大豆油のような薬剤可溶化物質を含有する場合（例えば、イントラリピッドの場合のように）は、薬剤は部分的または完全に担体液体内で可溶化され、その送達を助ける。そのような場合の例は、担体としてのイントラリピッド内のタキソールの送達である。この実施態様での使用に現在好適な生体適合性液体は、前述の

(56)

特表平8-507075

ような非経口栄養剤である。

本発明のさらに別の実施態様において、タキソールが非経口栄養剤に溶解している、タキソールのインビボ送達用の組成物が与えられる。

以下の非限定例を参照して、本発明を詳細に説明する。

#### 実施例 1

##### 油を含有する蛋白殻の調製

超音波プローブ（ヒートシステムズ（Heat Systems）、モデルXL2020）が接続できる円筒形の容器に、3 mlのUSP（米国薬局方）5%ヒト血清アルブミン溶液（アルファ・セラピューティック社（Alpha Therapeutic））を入れた。この

アルブミン溶液に6.5 mlのUSP級の大豆油を重層した。超音波プローブの先を2つの溶液の界面に入れ、装置を20℃の冷却浴に維持した。この装置を平衡化し、超音波装置を30秒間運転した。激しい混合が起き、白色のミルク様懸濁物が得られた。この懸濁物を通常の生理食塩水に1:5に希釈した。粒子カウンター（パーティクルデータシステムズ（Particle Data Systems）、エルゾン（Elzone）、モデル280PC）を用いて、油含有蛋白殻のサイズ分布と濃度を測定した。得られた蛋白殻は、最大断面直径が約 $1.35 \pm 0.73$ ミクロンであり、総濃度は元々の懸濁物で約 $10^9$ 殻/mlであることが測定された。

対照として、蛋白のない上記成分は、超音波照射した時安定な微小エマルジョンを形成しなかった。これは、後述の走査電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡試験により確認された。

#### 実施例 2

##### 高分子殻形成に影響する変数

高分子殻の形成を最適化するために、蛋白濃度、温度、超音波処理時間、薬理活性物質の濃度および音波強度などのいくつかの変数を試験した。トルエンを含有する架橋したウシ血清アルブミンについて、これらの変数を測定した。

蛋白濃度1%、2.5%、5%および10%の溶液から作成した高分子殻を粒子カウンターで測定して、産生された高分子殻のサイズと数の変化を求めた。高

(57)

特表平8-507075

分子殻のサイズは蛋白濃度で大きくは変化しなかったが、「ミルク様懸濁物」1 ml当たりの高分子殻の数は、蛋白濃度5%までは蛋白濃度の上昇に従って上昇した。それ以上の濃度では、高分子殻の数は有意な変化を示さなかった。

高分子殻の最適な調製のためには、最初の容器温度が重要であることがわかった。典型的には、最初の容器温度は、0℃と45℃の間に維持した。高分子殻の形成に使用した油の水-油界面張力は重要な変数であり、これも温度の関数として変化した。薬理活性物質の濃度は、蛋白殻の収率に有意に影響しなかった。薬理活性物質が溶解状態で取り込まれているか、または分散媒体中に懸濁されているかどうかは、あまり重要ではない。

超音波処理時間は、1 mlあたりに産生される高分子殻の数を決める重要な因子であった。3分間以上の超音波処理時間では、高分子殻の総数は低下し、過度の

超音波処理により高分子殻が破壊されている可能性があることを示していた。3分未満の超音波処理時間では、十分な数の高分子殻が産生された。

超音波装置の製造業者の提供する計算表によると、ここで使用した超音波装置の音波強度は約150ワット/cm<sup>2</sup>であった。強度が増加する順序で3つの音波強度を設定して、最大の強度で最大数の高分子殻が産生されることが見いだされた。

### 実施例 3

#### 溶解タキソールを含有する高分子殻の調製

USP級の大豆油中に2 mg/mlの濃度でタキソールを溶解した。超音波プローブが接続できる円筒形の容器に、3 mlのUSP級5%ヒト血清アルブミン溶液を入れた。このアルブミン溶液に6.5 mlの大豆油/タキソールを重層した。超音波プローブの先を2つの溶液の界面に入れ、装置を平衡状態で維持し、超音波装置を30秒間運転した。激しい混合が起き、油/タキソール溶液を閉じこめた蛋白性の壁の高分子殻を含有する、白色のミルク様懸濁物が得られた。

架橋高分子殻中に薬剤をたくさん充填するために、油と薬剤の相互溶媒（薬剤の方がかなり高い溶解性を有する）は油と混合することができる。この溶媒が比較的非毒性（例えば、酢酸エチル）であれば、これは最初の担体とともに注入す

(58)

特表平8-507075

ることができる。そうでない場合には、高分子殻の調製後これを真空下で蒸発除去する。

#### 実施例 4

##### 高分子殻の安定性

既知の濃度の高分子殻の懸濁物を、3つの異なる温度（すなわち、4℃、25℃および38℃）での安定性を解析した。安定性は、時間に対する粒子数の変化により測定した。大豆油（SBO）を含有する架橋蛋白（アルブミン）殻を前述のように調製し（実施例1を参照）、生理食塩水で希釈して最終濃度を20%として、室温より高い温度で保存した。時間の関数として各試料について得られた粒子数（エルゾン（Elzone））を表2に要約した。

表 2

日 数	生理食塩水中の蛋白殻 (# /ml · 10 <sup>10</sup> )		
	4℃	25℃	38℃
0	7.9	8.9	8.1
1	7.4	6.9	6.8
7	7.3	8.3	5.0
9	7.8	8.1	5.8
17	7.8	8.3	6.1
23	6.9	7.8	7.4
27	7.2	8.8	7.1

上記データにより示されるように、計測した粒子（すなわち、高分子殻）の濃度は、実験期間中はほとんど一定である。この範囲はほとんど一定で、約7-9 · 10<sup>10</sup>/mlであり、ほとんど4週間にわたって種々の温度条件で高分子殻の安定性は良好であることを示している。

#### 実施例 5

##### インビボ生体分布——発蛍光団を含有する架橋蛋白殻

静脈内注射の後に蛋白高分子殻内に捕捉された液体の摂取と生体分布を測定す

(59)

特表平8-507075

るために、蛍光色素（ルブレン（rubrene）、アルドリッチ（Aldrich）から入手可能）をヒト血清アルブミン（HSA）蛋白高分子殻内に捕捉しマーカーとして使用した。すなわち、ルブレンをトルエンに溶解して、トルエン／ルブレンを含有する架橋アルブミン殻を、前述のように超音波照射により調製した。得られたミルク様懸濁物を、通常の生理食塩水で5倍に希釈した。次に希釈懸濁物の2mlを、10分間かけてラットの尾静脈に注入した。注入1時間後に1匹のラットを屠殺し、24時間後にもう1匹を屠殺した。

高分子殻に捕捉された蛍光色素または放出された色素の有無について、肺、肝臓、腎臓、脾臓および骨髄の100ミクロンの凍結切片を、蛍光顕微鏡で観察した。1時間後では高分子殻の大部分は無傷（すなわち、直径約1ミクロンの明る

い蛍光性の粒子として現れた）のようであり、肺と肝臓に局在していた。24時間後には色素は肝臓、肺、脾臓および骨髄に観察された。組織全体の染色も観察され、高分子殻の殻壁は消化されており、中から色素が放出されていることを示していた。この結果は予想と一致しており、タキソールのような捕捉された薬剤の遅延または調節放出に対する、本発明の組成物の使用の可能性を示している。

#### 実施例 6

##### 大豆油（SBO）を含有する高分子殻の毒性

実施例1に記載したように、大豆油を含有する高分子殻を調製した。得られた懸濁物を通常の生理食塩水で希釈して、2つの異なる溶液（1つは20%のSBOを含有し、もう1つは30%のSBOを含有する）を作成した。

イントラリピッド（市販のTPN剤）は20%のSBOを含有する。マウスにおけるイントラリピッドのLD<sub>50</sub>は、1cc/分で注入した時、120ml/kg、すなわち30gのマウスについて約4mlである。

2群のマウス（各群3匹；各マウスの体重は約30g）を、下記のようにSBOを含有する本発明の組成物で処理した。各マウスに、SBO含有高分子殻の調製懸濁物4mlを注入した。1つの群の各マウスに、20%SBOを含有する懸濁物を与え、別の群の各マウスには、30%SBOを含有する懸濁物を与えた。

20%のSBOを含有する懸濁物を与えた群のすべての3匹のマウスは、各処



(60)

特表平8-507075

理で生き延び、SBO処理の1週間後に観察した時、どの組織や臓器にも大きな毒性は見られなかった。30%のSBOを与えた群のマウスの1匹のみが投与後に死んだ。これらの結果は、市販のSBO製剤（イントラリピッド）と比較すると、本発明の高分子殻内に封じ込められた油はそのLD<sub>50</sub>用量で毒性を示さないことを明瞭に示している。この効果は、高分子殻内からの油のゆっくりした放出（すなわち、生体が利用できるようになる調製された速度）に起因する。市販のエマルジョンでは油が高用量になるのに対して、このようなゆっくりした放出は、油が致死量になるのを防止する。

#### 実施例 7

##### 高分子殻から放出される大豆油のインビボバイオアベイラビリティ

ラットの血流中に高分子殻の懸濁物を注入後に、高分子殻に閉じこめた物質のゆっくりした放出すなわち徐放性を測定するために試験を行った。大豆油（SBO）を含有する、架橋した蛋白（アルブミン）壁の高分子殻を、前述したように超音波により調製した。得られた油含有高分子殻の懸濁物を、生理食塩水で希釈して20%の油を含有する最終懸濁物とした。この懸濁物5mlをカニューレで、10分かけてラットの外部頸静脈に注入した。注入の後数回の点でこれらのラットから血液を採取し、通常の測定放出で血中の中性脂肪（トリグリセリド）（大豆油は主に中性脂肪よりなる）を測定した。

5mlの市販の脂肪エマルジョン（イントラリピッド、水性非経口栄養剤——20%の大豆油、1.2%の卵黄リン脂質および2.25%のグリセロールを含有する）を対照として使用した。対照は、エマルジョンを安定化するために卵リン脂質を乳化剤として用いる。2つの場合の中性脂肪の血清レベルを比較することにより、時間の関数として油のバイオアベイラビリティが直接比較できるであろう。20%の油を含有する高分子殻の懸濁物以外に、生理食塩水中に最終濃度30%の油を含有する高分子殻の5mlの試料も注入した。3群のそれぞれに2匹のラットを使用した。各場合の中性脂肪の血中レベルを表3（単位はmg/dl）に示す。

(61)

特表平8-507075

表 3

群	血清中性脂肪 (トリグリセリド) (mg/dl)					
	前	1 hr	4 hr	24 hr	48 hr	72 hr
イントラリピッド 対照(20 % SBO)	11.4	941.9	382.9	15.0	8.8	23.8
高分子殻 (20% SBO)	24.8	46.7	43.8	29.3	24.2	43.4
高分子殻 (30% SBO)	33.4	56.1	134.5	83.2	34.3	33.9

注入前の血中レベルは、「前」と表示した欄に示す。イントラリピッド対照の場合には、明らかに注入後に非常に高い中性脂肪レベルが見られる。中性脂肪レベルが注入前のレベルに達するのに約24時間かかるのがわかる。油は注入後に

すぐ代謝に使用できることがわかる。イントラリピッドとして同量(20%)の油を含有する油含有高分子殻の懸濁物は、血清中の検出できる中性脂肪の劇的に異なる利用性を示す。そのレベルは通常の約2倍に増加し、このレベルで何時間も維持され、かなり正常に近いレベルで血中に中性脂肪がゆっくり放出、すなわち徐放されることを示している。30%の油を有する油含有高分子殻を投与した群は、中性脂肪のレベルがより高く(投与量が多いのに一致している)、48時間以内に正常値にもどっている。イントラリピッドを投与した群に比較して、この群でも中性脂肪の血中レベルはとてつもなく増加はしない。これも本発明の組成物からのゆっくり、すなわち徐々に利用されることを示しており、高分子殻内に封じ込められた物質の血中レベルが危険なほど高くなるのを避け、長期間にわたって許容されるレベルで利用できるという利点を有する。本発明の高分子殻内で送達された薬剤は、明らかにこれらと同じ利点を有するであろう。

このような大豆油含有高分子殻のような系は、総合非経口栄養剤(TFN)を作るために、アミノ酸、基本的な電解質、ビタミンおよび糖の水溶液に懸濁できる。現在入手できる脂肪乳化剤(例えば、イントラリピッド)では、電解質の存

(62)

特表平8-507075

在下での乳化剤の不安定性のために、このようなTPNは調製できないであろう。

#### 実施例 8

##### 薬理活性物質の固体核を含有する、架橋した蛋白壁の高分子殻の調製

高分子殻内のタキソールのように水溶性の低い薬剤を送達する別の方法は、固体の薬剤の核のまわりに高分子物質の殻を調製することである。このような「蛋白被覆」薬剤粒子は、以下のようにして得られる。タキソールを溶解する有機溶媒を比較的高濃度で使用して、実施例3に記載した方法を繰り返す。一般に使用される溶媒は、ベンゼン、トルエン、エチルエーテルなどである。高分子殻は実施例3に記載したように調製される。溶解したタキソールを含有する高分子殻のミルク様懸濁物の5 mlを、通常の生理食塩水で10 mlに希釈する。この懸濁物を室温でロータリーエバポレーターに入れて、真空下で揮発性有機物を除去する。ロータリーエバポレーター中で2時間後、これらの高分子殻を顕微鏡下で観察すると不透明の核が見え、これは実質的にすべての有機溶媒の除去と、蛋白の核内の固体タキソールの存在を示している。

あるいは、有機溶媒を含有する溶解した薬剤の核の高分子殻を凍結乾燥して、乾燥した砕けやすい粉末を得て、これを使用時に生理食塩水（または他の適当な液体）に再懸濁する。室温で固体状態ではない他の薬剤の場合には、液体の核の高分子殻を得る。この方法により、中に未希釈の薬剤を含有する架橋した蛋白壁の高分子殻が調製できる。粒子サイズの解析は、これらの高分子殻は油を含有するものより小さいことを示している。高分子殻の作成に使用するために現在好適な蛋白はアルブミンであるが、マクロファージ様細胞による高分子殻の摂取を増加させるために、 $\alpha$ -2-マクログロブリン、既知のオプソニンのような他の蛋白を使用することもできる。あるいは、インビボでの循環時間の増加した高分子殻を得るために、高分子殻の作成中にPEG-スルフヒドリル（後述）を添加してもよい。

#### 実施例 9

##### 高分子殻のインビボでの循環と放出動力学

(63)

特表平8-507075

タキソールを含有する固体核高分子殻を前述（例えば、実施例3を参照）のように調製し、通常の生理食塩水に懸濁した。懸濁物中のタキソールの濃度は、以下のようにHPLCにより測定した。まず0.1Mメルカプトエタノール（蛋白ジスルフィド結合架橋の交換と、高分子殻の架橋の破壊を引き起こす）の添加により、高分子殻内のタキソールを放出させ、次に放出したタキソールをアセトニトリルで懸濁物から抽出する。得られる混合物を遠心分離し、上澄液を凍結乾燥する。凍結乾燥物をメタノールに溶解し、HPLCに注入して、懸濁物中のタキソールの濃度を求める。タキソール濃度は約1.6mg/mlであった。

この懸濁物2mlを、頸静脈カテーテルを用いてラットに注入した。2時間後ラットを屠殺し、肝臓中に存在するタキソールの量をHPLCにより測定した。このために肝臓の破碎、次にアセトニトリルによる抽出、そして遠心分離後の上澄液の凍結乾燥が必要であった。凍結乾燥物をメタノールに溶解し、HPLCに注入した。2時間目には投与したタキソール量の約15%が回収され、相当量が肝臓にあることを示していた。この結果は、血中から小さい粒子を排除する肝臓の網内系の既知の機能に一致していた。

#### 実施例10

##### 架橋したPEG壁の高分子殻の調製

本発明の高分子殻の生成における、チオール（スルフヒドリル）を含有する蛋白を使用する代わりに、またはその付加物として、チオール含有PEGを調製した。PEGは非毒性であり、非炎症性であり、細胞に粘着せず、一般に生理的に不活性であることは公知である。これを、抗原性を低下させるために蛋白に結合させ、インビボでの循環時間を増加させるためにリボソーム形成脂質に結合させた。すなわち、基本的に蛋白の殻にPEGを導入すると、循環時間を増加させるとともに、高分子殻の安定性を向上させることが予測される。5%アルブミンに添加したPEG-チオールの濃度を変化させて、インビボで安定性の異なる高分子殻を得ることができた。PEG-チオールは文献に記載の方法で調製した（例えば、ハリスとヘラチ（Harris and Herati）、Polymer Preprints、32巻：154-155（1991））。

(64)

特表平8-507075

分子量2000g/mlのPEG-チオールを、5%アルブミン溶液中に1% (10mlに0.1gを加えた)の濃度で溶解した。実施例1に記載したように、この蛋白/PEG溶液に油を重層し、超音波処理をして架橋した蛋白とPEGよりなる壁を有する、油含有高分子殻を調製した。これらの高分子殻の安定性を実施例4に記載したように試験した。

チオール基で修飾され、PEGの代わりに使用できる他の合成水溶性高分子としては、例えば、ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、ポリアクリル酸、ポリエチルオキサゾリン、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリサッカライド(例えば、キトサン、アルギン酸塩、ヒアルロン酸、デキストラン、でんぷん、ペクチンなど)などがある。

例えば、インビボでの循環時間の長い過フッ化炭化水素含有蛋白殻は、血管系をイメージングするのに特に利点を有することがわかった。これらの殻は、殻壁内にPEGを含有しない殻に比較して、長期間循環系内にとどまった。これにより例えば、心臓循環系が見えるようになり、血管造影のような従来の侵襲的方法を用いる代わりに冠動脈循環系の非侵襲的評価手段が与えられる。

#### 実施例 1.1

免疫抑制剤を含有する高分子殻の静脈内送達を用いる、移植臓器への免疫抑制剤

#### のターゲティング

免疫抑制剤は、臓器移植後の拒絶作用を防止するために広く使用されている。特に、強い免疫抑制剤であるサイクロスポリンは、動物において皮膚、心臓、腎臓、すい臓、骨髄、小腸、および肺などの同種移植の生存を延長させる。サイクロスポリンは多くの動物種の種々の臓器における、体液性免疫をある程度抑制し、同種片拒絶、遅延型過敏症、実験的アレルギー性脳脊髄炎、フロイントアジュバント関節炎、および移植片対宿主疾患などの細胞性反応を強く抑制することが証明されている。サイクロスポリンを用いて、腎臓、肝臓および心臓の同種移植は成功している。

サイクロスポリンは現在、アルコールや油(例えば、コーン油、ポリオキシエチル化グリセリドなど)のサイクロスポリンの溶液を含有するカプセルとして、

(65)

特表平8-507075

またはオリーブ油、ポリオキシエチル化グリセリドなどの溶液として、経口型で送達される。これはまた、静脈内注入により投与される。この場合、サイクロスポリンはエタノール（約30%）やクレマフォール（Cremaphor）（ポリオキシエチル化ひまし油）に溶解し、これを注入前に通常の生理食塩水または5%デキストロースで1:20~1:100に希釈しなければならない。静脈内（iv）注入に比較して、経口溶液の絶対的バイオアベイラビリティは約30%である（サンド・ファーマシューチカル・コーポレーション（Sandoz Pharmaceutical Corporation）、刊行物SDI-Z10（A4）、1990）。一般にサイクロスポリンの送達は、現在実施されているタキソールの静脈内送達と同じ問題、すなわちクレマフォール（静脈用製剤に使用される送達担体）によると考えられるアナフィラキシー反応やアレルギー反応の問題がある。さらに、前述のようにカプセル化した薬剤（例えば、サイクロスポリン）の静脈内送達は、薬剤の投与直後に危険なピーク血中レベルに達するのを避けることができる。例えば、サイクロスポリンの現在利用できる製剤と、前述のカプセル化型のサイクロスポリンを比較すると、注入直後のサイクロスポリンのピーク血中レベルは5倍低下した。

クレマフォールに関連する問題を避けるために、前述の高分子殻内に含有されるサイクロスポリンは静脈内注入により送達される。これは生体適合性油またはいくつかの他の溶媒に溶解し、次に前述の超音波処理により高分子殻内に分散さ

れる。さらに、高分子殻中でサイクロスポリン（または他の免疫抑制剤）を送達する重要な利点は、肝臓中の網内系による注入された物質の摂取により局所ターゲティングができることである。これは、局所ターゲティングのため全身の毒性をある程度避けることができ、有効投与量を減少させることができる。静脈内注入後の高分子殻内に封じ込められたタキソールの、肝臓への送達とターゲティングの有効性を実施例9に示す。本発明に従ってサイクロスポリン（または他の推定の免疫抑制剤）の送達についても同様の結果が予測される。

#### 実施例12

##### 高分子殻の抗体ターゲティング

本発明の高分子殻の性質により、高分子殻へのモノクローナル抗体またはポリ

(66)

特表平8-507075

クローナル抗体の結合、またはポリペプチド内への抗体の取り込みが可能になる。抗体は高分子殻の形成中に高分子殻内に取り込むこともできるし、またはその調製後に高分子殻内に取り込むこともできる。この目的のために標準的な蛋白固定化法が使用される。例えば、アルブミンのような蛋白から調製される蛋白マイクロカプセルでは、適切に修飾された抗体の結合のためにアルブミンのリジン残基上の多くのアミノ基が利用できる。例として、高分子殻の形成中にガンに対する抗体を高分子殻内に取り込むか、または高分子殻の調製後ガンに対する抗体を高分子マイクロカプセル殻に結合させることにより、抗ガン剤をガンに送達することができる。別の例としては、高分子殻の形成中に標的細胞上のリセプターに対する抗体を高分子殻内に取り込むか、または高分子殻の調製後標的細胞上のリセプターに対する抗体を高分子マイクロカプセル殻に結合させることにより、遺伝子生成物を特異的な細胞（例えば、肝細胞、または骨髄中のある種の幹細胞）に送達することができる。さらに、ある種の細胞型の核に、カプセル化した生成物をターゲティングするために、核リセプターに対するモノクローナル抗体を使用することができる。

### 実施例 13

#### ポリヌクレオチド作成体、酵素およびワクチンの運搬体として高分子殻

遺伝子療法が実際の治療の選択肢の1つとして広く受け入れられるようになり（現在、40以上の遺伝子移植の提案がNIHおよび／またはFDAの審査委員会により認められている）、この治療法を実施するのに克服すべき1つの障害は、ヒトの細胞のゲノム内に遺伝物質を取り込むためにウイルスベクターを使用することに対する抵抗である。ウイルスは本質的に有毒である。従って遺伝子療法（特に、致死的でない、遺伝性でない疾患の治療）にウイルスベクターを使用することにつきまとう危険は許容できない。残念ながら、ウイルスベクターを使用しないで移植したプラスミドは普通、標的細胞のゲノムの中に取り込まれない。さらに、従来の薬剤と同様に、このようなプラスミドは体内での半減期が限られている。従って遺伝子療法（遺伝子療法の逆の形であるアンチセンス療法の場合も同じである、ここでは遺伝子発現を阻止するために核酸またはオリゴヌクレオ

(67)

特表平8-507075

チドが導入される)の実施に対する一般的な制限は、細胞膜を通過するには大きすぎる核酸またはオリゴヌクレオチドを有効に送達できないことである。

前述の蛋白マイクロカプセル殻内へのDNA、RNA、プラスミド、オリゴヌクレオチド、酵素などのカプセル化は、これらの肝臓、肺、脾臓、リンパ節および骨髄への送達を促進する。すなわち、本発明において、このような生物製剤は、ウイルスベクターを使用することにつきまとう危険なしで細胞内に送達できる。この型の製剤は血流から網内系の細胞に直接に、筋肉内注入により筋肉細胞に、またはガンに直接注入することにより、高分子殻の非特異的摂取またはエンドサイトーシスを促進する。さらに、カプセル化生成物を特定の細胞型の核にターゲティングするのに、核リセプターに対するモノクローナル抗体を使用することができる。

このような作成体にターゲティングされる疾患としては、糖尿病、肝炎、血友病、嚢胞性繊維症、多発性硬化症、ガン一般、インフルエンザ、AIDSなどがある。例えば、インスリン様成長因子(IGF-1)の遺伝子は、糖尿病性抹消神経症や悪液質の治療のために、送達用に蛋白マイクロカプセル殻中にカプセル化される。第IX因子や第VIII因子(血友病の治療に有用である)をコードする遺伝子は、本発明の蛋白マイクロカプセル殻へのカプセル化により、肝臓にターゲティングすることができる。同様に低密度リボ蛋白(LDL)リセプターの遺伝子も、動脈硬化症の治療のために、本発明の蛋白マイクロカプセル殻へのカプセル化により、肝臓にターゲティングすることができる。

本発明の実施に有用な他の遺伝子は、ガン細胞に対して体の免疫応答を再刺激する遺伝子である。例えば、プラスミドに封じ込められたDNAによりコードされたHLA-B7のような抗原は、直接ガン(例えば、皮膚ガン)に注入するために、本発明の蛋白マイクロカプセル殻中に取り込まれる。いったんガンの中に入ると、これはガン特異的細胞に向かい、これがサイトカイン(例えば、IL-2)のレベルを上昇させ、これがガンを免疫系攻撃の標的にする。

別の例として、アデノ関連ウイルスゲノムの一部を有するプラスミドの、本発明の蛋白マイクロカプセル殻へのカプセル化が考えられる。さらに、本発明のマ



(68)

特表平8-507075

マイクロカプセル殻は、種々のガンや感染症に対する養子免疫治療法のために、C D 8 + T 細胞に治療用遺伝子を送達するのに使用できる。

本発明の蛋白マイクロカプセル殻はまた、例えばB型肝炎ウイルスに対するアンチセンスヌクレオチドのターゲティングされた送達を介して感染症と闘うための送達系として使用することができる。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの1つの例は、B型肝炎ウイルスのポリアデニル化シグナルに対する21量体のホスホロチオエートである。

本発明の蛋白マイクロカプセル殻はまた、嚢胞性繊維症のトランスメンブランレギュレーター (C F T R) 遺伝子の送達に使用できる。この遺伝子が欠如している人は嚢胞性繊維症を発症するが、これはC F T R 遺伝子を含む本発明の蛋白マイクロカプセル殻を噴霧して、直接肺の中に吸入することにより治療することができる。

酵素も本発明の蛋白マイクロカプセル殻を用いて送達することができる。例えば、酵素DNA<sub>ase</sub>はカプセル化されて、肺に送達される。同様にリボザイムもカプセル化して、高分子殻の外側に適切な抗体を結合させることにより、ウイルスエンベロープ蛋白またはウイルス感染細胞にターゲティングすることができる。ワクチンも本発明の蛋白マイクロカプセル殻中にカプセル化され、皮下、筋肉内または静脈内送達に使用される。

#### 実施例 14

##### 赤血球代替物として使用するための不溶性ヘモグロビン作成体 (IHC) の調製

合成実験の前に、使用したすべての装置とともに、20 mlのガラスの反応セル

チタン製のホーン (horn) およびカラー (collar) を、アルコールと無菌生理食塩水で洗浄した。典型的な反応では、超音波ホーン (ヒートシステムズ (Heat Systems)、XL 2020、20 KHz、400 W最大出力) に接続した反応セルに、3.5 mlの5% w/vのヘモグロビン (ヒトまたはウシ) を加えた。次にホーンとカラーを55℃に設定した温度調節浴に沈めた。55℃での反応は最適のようであったが、生成物は広範囲の温度 (0~80℃) で合成することができる。

(69)

特表平8-507075

pHは6.8であった。高収率を得るには温度調節が非常に重要であり、最適温度は具体的な実験条件により異なる。超音波電源は出力7でセットした。製造業者の計算表からは、出力は約150W/cm<sup>2</sup>であった。反応は約30秒間で完了する。これより短い時間または長い時間でも収率は低下するようであった。ウシヘモグロビンでは、2.5%w/v溶液をセファデックスG-25ゲル透過カラムに通して、リン酸塩のような陰イオンを除いた。ヒトヘモグロビンIHCの典型的な合成では、超音波ホーンは空気と水の界面に置いた。產生された均一な懸濁液は、蛋白性の赤血球を含有する。次に水性懸濁液を無菌容器中に4℃で保存する。

典型的な反応では、平均殻直径が3ミクロンで標準偏差が1ミクロンの、1ml当たり約 $3 \times 10^8$ 個のIHC殻を含有する溶液が得られる。この合成法では、サイズ分布の狭い高濃度のミクロンサイズの生物材料が得られる。

合成後、IHCは未変性の蛋白溶液中の懸濁液のままである。IHCを未反応の蛋白から分離するために、いくつかの方法（濾過、遠心分離および透析）を用いた。最初の方法では、孔の直径が0.2ミクロン（ワットマン（Whatman, Inc））のアノトップ（Anotop）シリンジフィルターを通して混合物を濾過した。濾液が蛋白をほとんどまたは全く含まなくなる（UV-可視分光法で測定した）まで、数倍量の水でフィルターを洗浄した。フィルターからIHCを「逆洗浄」して等量の生理食塩水に再懸濁液した。2回目の濾過法では、分子量カットオフが100キログルトン（kD）のセントリコン（Centricon）遠心分離フィルターを用いた。遠心分離フィルターは、中間の濾過膜で分離される遠心分離チューブである。IHC溶液を1000Gで5分間遠心分離することにより、未反応のヘモグロビン（64.5kD）の大部分は膜を通過した。最後に大きい分子量（300kD）膜で透析してIHCを精製した。しかしこの方法では約2日の透析が必要であった。

IHCの精製の好適な精製法は、セントリコン（Centricon）遠心分離である。

#### 実施例 15

赤血球代替物としての不溶性ヘモグロビン／アルブミン作成体（IHAC）の調

(70)

特表平8-507075

製

合成実験の前に、使用したすべての装置とともに、20 mlのガラスの反応セル、チタン製のホーン (horn) およびカラー (collar) を、アルコールと無菌生理食塩水で洗浄した。典型的な反応では、超音波ホーン (ヒートシステムズ (Heat Systems)、XL 2020, 20 KHz、400 W最大出力) に接続した反応セルに、3.5 mlの5% w/vのヘモグロビン (ヒトまたはウシ; ヘモグロビン/アルブミン碑は、5から2まで変化した) を加えた。次にホーンとカラーを55℃に設定した温度調節浴に沈めた。55℃での反応は最適のようであったが、生成物は広範囲の温度 (0~80℃) で合成することができる。pHは6.8であった。高収率を得るには温度調節が非常に重要であり、最適温度は具体的な実験条件により異なる。超音波電源は出力7でセットした。製造業者の計算表からは、出力は約150 W/cm<sup>2</sup>であった。反応は約30秒間で完了する。これより短い時間または長い時間でも収率は低下するようであった。產生された均一な懸濁液は、蛋白性の赤血球代替物を含有する。次に水性懸濁液をろ過、洗浄し、無菌緩衝化生理食塩水に再懸濁して、無菌容器中に4℃で保存する。

前述のように典型的な反応では、平均殻直径が3ミクロンで標準偏差が1ミクロンの、1 ml当たり約10<sup>8</sup>個の殻を含有する溶液が得られる。この合成法では、サイズ分布の狭い高濃度のミクロンサイズの生物材料が得られる。

あるいは、IHCの連続的な処理を可能にするフロースルー (flow-through) 系を使用することもできる。そのような系は、ヘモグロビンおよび随時生体適合性油またはフルオロカーボンの流れを、超音波プローブの付いた反応容器中に連続的に入れるポンプよりなる。容器中で適当な滞留時間が維持され、容器からあふれるIHCは回収タンクに回収される。

実施例 16カプセル化過フッ化炭化水素含有不溶性ヘモグロビン作成体の調製

合成実験の前に、使用したすべての装置とともに、20 mlのガラスの反応セル

チタン製のホーン (horn) およびカラー (collar) を、アルコールと無菌生理食

(71)

特表平8-507075

塩水で洗浄した。典型的な反応では、超音波ホーン（ヒートシステムズ（Heat Systems）、XL2020、20 KHz、400 W最大出力）に接続した反応セルに、3.5 mlの5% w/vのヘモグロビン（ヒトまたはウシ）を加えた。反応容器に過フッ化炭化水素である、パーフルオロデカリン3.5 mlを加えた。次にホーンとカラーを20℃に設定した温度調節浴に沈めた。pHは6.8であった。超音波電源は出力7でセットした。製造業者の計算表からは、出力は約150 W/cm<sup>2</sup>であった。反応は約30秒間で完了する。これより短い時間または長い時間でも収率は低下するようであった。産生された均一な懸濁液は、内部にカプセル化されたパーフルオロデカリンを有する、架橋不溶性ヘモグロビン殻のマイクロカプセルまたは微小球を含有する。ミルク様の懸濁液を濾過、洗浄し、前述の無菌緩衝化生理食塩水に再懸濁して、無菌容器中に4℃で保存する。

前述のように典型的な反応では、平均殻直径が3ミクロンで標準偏差が1ミクロンの、1 ml当たり約10<sup>8</sup>個の殻を含有する溶液が得られる。この合成法では、サイズ分布の狭い高濃度のミクロンサイズの生物材料が得られる。

#### 実施例 17

##### カプセル化過フッ化炭化水素含有不溶性アルブミン作成体の調製

合成実験の前に、使用したすべての装置とともに、20 mlのガラスの反応セル、チタン製のホーン（horn）およびカラー（collar）を、アルコールと無菌生理食塩水で洗浄した。典型的な反応では、超音波ホーン（ヒートシステムズ（Heat Systems）、XL2020、20 KHz、400 W最大出力）に接続した反応セルに、3.5 mlの5% w/vのヘモグロビン（ヒトまたはウシ）を加えた。反応容器に過フッ化炭化水素である、パーフルオロデカリン（または、パーフルオロトリプロピルアミン）3.5 mlを加えた。次にホーンとカラーを20℃に設定した温度調節浴に沈めた。pHは6.8であった。超音波電源は出力7でセットした。製造業者の計算表からは、出力は約150 W/cm<sup>2</sup>であった。反応は約30秒間で完了する。これより短い時間または長い時間でも収率は低下するようであった。産生された均一な懸濁液は、内部にカプセル化されたパーフルオロデカリン（または、パーフルオロトリプロピルアミン）を有する、架橋不溶性アルブミン殻のマ

(72)

特表平8-507075

イクロカプセルまたは微小球を含有する。ミルク様の懸濁液を汙過、洗浄し、前述の無菌緩衝化生理食塩水に再懸濁して、無菌容器中に4℃で保存する。

前述のように典型的な反応では、平均殻直径が3ミクロンで標準偏差が1ミクロンの、1 ml当たり約 $10^8$ 個の殻を含有する溶液が得られる。この合成法では、サイズ分布の狭い高濃度のミクロンサイズの生物材料が得られる。

#### 実施例 18

ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) のようなアロステリック修飾因子でさらに修飾した不溶性ヘモグロビン作成体

酸素に対して異なる親和性(すなわち、異なる $P_{50}$ )を有するヘモグロビン作成体を得るために、IHCをPLP(公知のアロステリック修飾因子)とさらに反応させた。トリス中のIHC(実施例14のように得られた)の懸濁物を窒素下で10℃で酸素を除去した。酸素を除去したIHC懸濁物の10 mlを、6個の別々の反応容器に取った。異なるモル比のPLP/Hbを各反応容器に加えた。これらは、0.1/3.0、0.75/3.0、1.5/3.0、3.0/3.0、4.2/3.0、6.0/3.0である。30分後、10倍過剰量の水素化ホウ素ナトリウムを加え、さらに30分間シッフ塩基を還元した。次に懸濁物を遠心分離により汙過し、緩衝化生理食塩水で3回逆洗浄し、緩衝化生理食塩水に再懸濁し、4℃に保存した。この修飾は、デオキシヘモグロビンの $\beta$ -グロビンのアミノ末端基をターゲットとする。この点でこの修飾は、デオキシ高次構造を安定化する2,3-DPG(リジンEF6(82)bで結合する)の作用に非常によく似ている。

この6つの程度の異なる修飾により、PLP置換の程度の増加により $P_{50}$ が増加する(酸素親和性が低下する)IHCが得られるであろう。

#### 実施例 19

ヘモグロビンとポリエチレングリコールの架橋した殻を有する不溶性作成体

ポリエチレングリコール(PEG)非毒性であり、非炎症性であり、細胞に粘着せず、一般に生理的に不活性であることは公知である。PEGが結合した蛋白は、抗原性が低いことが見いだされている。リボソームと結合すると、PEGの結合/取り込みにより循環時間が増加することが見いだされた。すなわち、赤血

(73)

特表平8-507075

球にPEGを導入すると、循環時間を増加させることが予測される。蛋白に加えたPEG-チオールの濃度を变化させて、安定性の異なるPEG-ヘモグロビンを調製することができた。PEG-チオールは文献に記載の方法で調製した(例えば、ハリスとヘラチ(Harris and Herati)、Polymer Preprints、32巻:154(1991))。

分子量2000g/mlのPEG-チオールを、5%ヘモグロビン溶液中に1%(10mlに0.1gを加えた)の濃度で溶解した。この蛋白/PEG溶液を実施例14に記載したように超音波処理をして、蛋白性赤血球代替物を作成した。

#### 実施例20

##### 殻の外側にポリエチレングリコールが共有結合した不溶性ヘモグロビン作成体

IHCを実施例14に記載したように調製した。文献の方法(ボーチャンプ(Beauchamp)ら、Analytical Biochemistry、131:25-33、1983)に従い、分子量10,000(PEG 10k)のポリエチレングリコールを1,1'-カルボニルジイミダゾールCDIと反応させた。IHCを50mMのホウ酸塩緩衝液pH8.0に懸濁し、PEG-CDI(総ヘモグロビンリジンに対して2倍モル量過剰)を加え、反応混合物を室温で6時間攪拌した。次に得られたPEG-IHCを濾過して分離し、生理食塩水で洗浄し、無菌の緩衝化生理食塩水に再懸濁した。

#### 実施例21

##### 不溶性ヘモグロビン作成体の作成に影響する変数

IHCの作成を最適化するために、蛋白濃度、温度、超音波時間、音波強度、pHなどのいくつかの変数を試験した。

これらの材料は、1%、2.5%、5%、そして10%のヘモグロビン溶液から調製した。これらはまた、1から10%まで変化する濃度で、ヘモグロビンとヒト血清アルブミンのような混合蛋白溶液から調製した。サイズと濃度は粒子カウンターで測定した。サイズは出発時の蛋白濃度と大きく異なっていないかった。蛋白濃度が約5%までは蛋白濃度の増加にともない数が増加した。この濃度より上では、数の有意な変化は起きなかった。

IHCの最適な調製には、最初の容器温度が重要であることがわかった。典型

(74)

特表平8-507075

的には、最初の反応温度は0～80℃に維持した。最適な出発温度は約70℃であった。

超音波時間も、1mlあたりに産生されるIHCの数を決める重要な因子であった。高濃度のIHCの合成には、約30秒の超音波時間が良好であることが見出された。これより長い時間または短い時間ではIHCの数は少なかったが、それでも十分な数であった。

製造業者の提供する計算表によると、これらの実験で使用した超音波装置の音波の強度は約150ワット/cm<sup>2</sup>である。他の強度の設定でも多数のIHCが得られた。

#### 実施例 2.2

##### 脂溶性薬剤の薬剤運搬体としての不溶性ヘモグロビン作成体

いくつかの抗新生物薬剤の細胞毒性効果は、酸素の存在下で大きく上昇する。従って、ガン部位での酸素濃度を増加させながら、そこに薬剤を送達することが好ましい。本発明のヘモグロビン微小球はこの能力を有する。前述の実施例16はまた、不溶性ヘモグロビンの殻内の過フッ化炭化水素液体のカプセル化を記載している。シクロホスファミド、BCNU、メルファラン、タキソール、カンパトテシン、アドリアマイシン、エトポシドなどの細胞毒性薬剤は、過フッ化炭化水素または他の適切な油（例えば大豆油）に溶解して、ヘモグロビン作成体中にカプセル化することができる。

タキソールを大豆油(SBO)中に5mg/mlの濃度で溶解した。3.5mlの5%ヘモグロビン溶液を反応容器に取り、この容器に3.5mlのSBO/タキソールを加えた。実施例16に記載したようにこの2層の混合物を超音波処理して、SBO/タキソールを含有する架橋した不溶性ヘモグロビン殻を得た。

#### 実施例 2.3

##### 水溶性薬剤の薬剤運搬体としての高分子殻

いくつかの水溶性薬剤は、高分子殻内にカプセル化される候補である。例としてメソトレキセートを5mg/mlの濃度で水に溶解した。この水溶液1mlを、プルロニック(Pluronic)-65(ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロック共重合体)を用いて、4mlの大豆油で乳化し、安定な油注水(W/

(75)

特表平8-507075

○) 微小エマルジョンを作成した。3.5 mlの5%ヘモグロビン溶液を、3.5 mlのこのW/O微小エマルジョンで重層し、30秒間超音波処理をして、メソトレキセートを有するカプセル化微小エマルジョンを含有する不溶性ヘモグロビン作成体を得た。

#### 実施例 24

##### 蛋白運搬体としての高分子殻

いくつかの蛋白は、高分子殻内にカプセル化される候補である。例えば、ヘモグロビン、アルブミンなど。例えば、IHCにヘモグロビンを充填する量を増加させる方法として、実施例23の水溶性薬剤の代わりにヘモグロビンをIHC中にカプセル化することができる。ヘモグロビンを10%の濃度で水に溶解した。この水溶液1 mlを、プルロニック (Pluronic) -65 (ポリエチレンオキシドとポリプロピレンオキシドのブロック共重合体) を用いて、4 mlの大豆油で乳化し、安定な油注水 (W/O) 微小エマルジョンを作成した。3.5 mlの5%ヘモグロビン溶液を、ヘモグロビンを含有する3.5 mlのこのW/O微小エマルジョンで重層した。2層の混合物を30秒間超音波処理をして、ヘモグロビンを有するカプセル化微小エマルジョンを含有する不溶性ヘモグロビン作成体を得た。この方法は、IHCの微小球当たりのヘモグロビンの総量を増加させるのに有効であり、従って結合した酸素に対する酸素運搬容量を増加させた。

#### 実施例 25

##### アルブミン/過フッ化炭化水素作成体のインビボ投与—生体分布を検出するための磁気共鳴画像法 ( $^{19}\text{F}$ -MRI)

パーフルオロノナンを含有するアルブミン作成体を実施例17に記載したように調製した。最終懸濁物は、無菌生理食塩水中の過フッ化炭化水素の20容量%とした。この懸濁物2 mlを、ケタミン (ketamine) で麻酔したスプラグ・ドーレイ (Sprague Dawley) ラットに、尾静脈を介して注入した。過フッ化炭化水素のインビボ分布を、ブルカー (Bruker) 500 MHz NMR 装置で $^{19}\text{F}$ -MRIにより追跡した。ラットを10 cmの $^{19}\text{F}$ コイル中に入れ、TR = 1秒、TE = 20ミリ秒、そして $256 \times 128$ のデータマトリックスで $T_1$ 加重シーケンスを用いて画像を得た。



(76)

特表平8-507075

投与の1時間後、FCの大部分は肝臓、肺、そして脾臓に蓄積していた。FCの一部は骨髄にも検出された。局在化と蓄積の観点から、ヘモグロビン作成体は同じように挙動することが予測される。これらの観察は、放射線療法の補助的手段としての細胞毒性薬剤の局所送達とともに、高容量の酸素による、肝臓ガンや肺ガンそしておそらく骨髄の新生物細胞の治療に対する重要な意味がある。

#### 実施例 26

##### 薬剤運搬体作成体のインビボ投与

実施例22のようにカプセル化タキソール(SBO中)を含有する不溶性ヘモグロビン作成体を調製した。最終懸濁物は、無菌生理食塩水中で20容量%のSBOとした。この懸濁物2mlを、ケタミン(ketamine)で麻酔したスブラーグ・ドーレイ(Sprague Dawley)ラットに、尾静脈を介して注入した。

注入の2時間後ラットを屠殺し、肝臓を回収した。肝臓を少量の生理食塩水で摩砕し、酢酸エチルで抽出した。抽出物を凍結乾燥し、メタノールに溶解し、HPLCカラムに注入した。代謝されていないタキソールの最初の容量の約15%が肝臓から回収された。これが、組織への酸素の送達とともに肝臓への抗新生物剤のターゲティングの実用性を決めた。

#### 実施例 27

##### 不溶性ヘモグロビン血液代替物に対する急性血液交換モデル

麻酔したスブラーグ・ドーレイラット(350~400g)に外部頸静脈からカテーテルを入れる。10分間かけてその血液の約70%を取った。さらに10分間ラットをこの状態で維持し、次に $P_{50}$ が28mmHgの酸素化IHCの同膨張性懸濁物を再注入する。平均動脈圧、心拍および呼吸速度を連続的に追跡する。これらのラットの生存の時間をかけて追跡する。

#### 実施例 28

##### 組織虚血の逆転のための不溶性ヘモグロビン作成体

虚血部位へ優先的に酸素を送達するIHCの能力を試験する。「高親和性」の(すなわち、 $P_{50} < 28$  mmHg) IHCは、酸素濃度勾配が循環系で通常遭遇する場合より高い部位(すなわち、虚血部位)でのみ酸素を放出するため、IHCはこの目的に好適である。この目的のために $P_{50}$ が20 mmHgのIHCを使用する。

(77)

特表平8-507075

「脳卒中」すなわち脳虚血のモデルとして、両側の頸動脈が閉塞したラットを使用する。ケタミンで麻酔したスプライン・ドーレイラットの両側の頸動脈を一時的に結糸する。対照ラットでは、結糸を15分間後にはずし、正常な血流を再開させる。酸素化装置中でIHC懸濁物の外部酸素化の後に、生理食塩水中の高親和性IHC懸濁物1mlを、実験ラットの各頸動脈に直接注入する。この処理の24時間後、ラットを屠殺して脳を取り出し、固定し、切片を作成し、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)またはトリパンブルーで染色して死滅した細胞の程度を測定する。IHCを投与したラットでは、細胞の死滅の程度(トリパンブルー染色で測定)は低いと予測される。

#### 実施例 29

##### 不溶性ヘモグロビン作成体のインビボ循環系での半減期の評価

麻酔したスプライン・ドーレイラット(350~400g)に外部頸静脈からカテーテルを入れる。ラットの血液量の20%に等しいIHCの同膨張性懸濁物を、カテーテルを通して一気に注入する。0.25から92時間にわたるサンプリング時間で血液を採取する。血液試料を遠心分離し、溶血すなわち可溶性ヘモグロビンの存在について血漿を観察する。IHCの「微泡」は内部が気体である(従って、水より低密度である)ため、遠心分離により血漿の表面に上がってくる。微泡をすくい取り、生理食塩水に再懸濁し、粒子カウンターで計測する。次に、循環系中のIHCの半減期を求める。先行技術のヘモグロビンに基づく血液代替物に比較して、本発明のIHCは循環系での半減期が長いことが予測される。

#### 実施例 30

##### 臓器保存のためのIHC-ラットの心臓の保存

麻酔したスプライン・ドーレイラットから、外科的に心臓を取り出し、室内の空気で人工的に呼吸させる。心臓を、IHC(またはIHC/FC、またはアルブミン/FC)保存培地と同じ組成であるがヘモグロビン成分のない、クリスタロイド培地(「心臓痺瘳培地」(Cardioplegia medium)-CM)に浸漬する。心臓を、11℃に冷却しながらCMで数分間灌流する。次にIHC保存培地140mlで12℃で12時間保存する。低い圧力(18mmHg)でIHC培地を心臓に

(78)

特表平8-507075

連続的に灌流し、95%酸素/5%炭酸ガスで連続的に平衡化させる。12時間の

保存の後、別のラット心臓機能装置を用いて、心臓の収縮機能、ポンプ機能およびエネルギー機能を試験する。

### 実施例 3.1

#### 心臓切開手術のための心臓麻痺における IHC 培地の有用性

大動脈を適切にクランプで止め通気した後、心肺機能バイパスを開始し、酸素運搬体として IHC (または IHC/FC、またはアルブミン/FC) を含有する酸素化「心臓麻痺培地」を 4℃ で、大動脈の根元に 500 から 100 ml で一気に送達する。冷培地をさらに左および右冠動脈口に送達し、バイパス手術の場合は、最後の吻合の前に移植片の末端にも培地を送達する。心筋を冷却した温度に充分維持できる量で、15 から 20 分毎に培地を送達する。この処理が完了後、大動脈クランプをはずし、心臓を再度暖める。

### 実施例 3.2

#### 血管形成術または動脈切除における IHC 培地の有用性

閉塞したかまたは灌流の不十分な臓器の領域に流れを回復するために、介入操作の最中に IHC (または IHC/FC、またはアルブミン/FC) 培地を投与する。そのような操作の例としては、血管形成術と動脈切除術がある。経皮経管冠動脈形成術のバルーン膨張時に、膨張バルーンカテーテルの中央管腔を介して約 60 ml/分の速度で酸素化した IHC 培地を送達することにより、局所的虚血を緩和することができる。この培地は体温で投与され、例えば生理的に融和性のリンゲル電解質および基質を含有する。各バルーン膨張時に、酸素で平衡化した IHC 培地を灌流する。動脈切除術 (これは血管中の閉塞をナイフやレーザーで物理的に除去するために行われる) のバルーン膨張の時にも同様の方法が行われる。閉塞の末端が溶解されている時に酸素を供給するために、酵素的血栓溶解時に閉塞した血管への培地の直接注入も行われる。現在いくつかの血管形成術の最中にフルオゾル DA が使用されるが、本発明の IHC (または IHC/FC、またはアルブミン/FC) 培地がフルオゾル DA に取って代わるであろう。

(79)

特表平8-507075

### 実施例 3 3

#### 高分子殻内に捕捉されたドデカフルオロノナン ( $C_9F_{20}$ ) の合成

合成実験の前に、使用したすべての装置とともに、20 mlのガラスの反応セル

チタン製のホーン (horn) およびカラー (collar) を、アルコールと無菌生理食塩水で洗浄した。典型的な反応では、超音波ホーン (ヒートシステムズ (Heat Systems)、XL 2020, 20 KHz、400 W 最大出力) に接続した反応セルに、3.5 mlの無菌の5% w/v USP (米国薬局方) ヒト血清アルブミン (アルファ・セラピューティックス社 (Alpha Therapeutics Corporation)) を加えた。次にホーンとカラーを22℃に設定した温度調節浴に沈めた。22℃での反応は最適のようであったが、生成物は広範囲の温度 (0~40℃) で合成することができる。高収率を得るには温度調節が非常に重要であり、最適温度は具体的な実験条件により異なる。

次に、6 mlのドデカフルオロノナン ( $C_9F_{20}$ ) を加え、超音波電源は出力7でセットした。加えた過フッ化炭化水素の量は1 ml未満から約13 mlまで変化し、高分子殻の収率は良好である。反応は約30秒間で完了する。これより短い時間または長い時間でも収率は低下するようであった。産生された均一な懸濁液は、蛋白性の高分子殻中に捕捉されたドデカフルオロノナンを含有し約60容量%のパーフルオロノナンである。次に水性懸濁液を無菌容器中に4℃で保存する。

典型的な反応では、平均殻直径が2ミクロンで標準偏差が1ミクロンの、1 ml当たり約  $1 \times 10^9$  個の殻を含有する溶液が得られる。この合成法では、サイズ分布の狭い高濃度のミクロンサイズの生物材料が得られることがわかる。

### 実施例 3 4

#### 高分子殻内に捕捉されたパーフルオロトリブチルアミン ( $C_{12}F_{27}N$ ) とパーフルオロトリプロピルアミン ( $C_9F_{21}N$ ) の合成

5% w/v のUSPヒト血清アルブミン (3.5 ml) とフルオロアミン (6 ml) をガラス反応セルに加え、高強度の超音波を照射した。反応条件は、強度設定が7であり、浴温度は22℃であり、反応時間は約30秒であった。蛋白高分子

(80)

特表平8-507075

殻内に捕捉された高濃度のパーフルオロトリプロピルアミン〔 $(C_3F_7)_3N$ 〕とパーフルオロトリブチルアミン〔 $(C_4F_9)_3N$ 〕が、平均直径2ミクロンで合成される ( $1 \times 10^9$  殻/ml)。

### 実施例 3 5

#### 高分子殻内に捕捉されたパーフルオロデカリン ( $C_{10}F_{18}$ ) の合成

5% w/v の USP ヒト血清アルブミン (3.5 ml) とパーフルオロデカリン ( $C_{10}F_{18}$ ; 6 ml) をガラス反応セルに加え、高強度の超音波を照射した。反応条件は、強度設定が7であり、浴温度は22℃であり、反応時間は約30秒であった。蛋白高分子殻内に含有された高濃度の狭いサイズ分布のパーフルオロデカリンが合成された。さらに、パーフルオロデカリンとパーフルオロトリプロピルアミンはFDAが認可した過フッ化炭化水素 (フルオゾルDA) の主成分であるため、これらの化合物の医薬としての使用は、規制当局に容易に認可されるであろう。

### 実施例 3 6

#### 高分子殻内に捕捉されたパーフルオロ15-クラウン-5 ( $C_{10}F_{20}O_5$ ) の合成

5% w/v の USP ヒト血清アルブミン (3.5 ml) とフルオロクラウネーテル ( $C_{10}F_{20}O_5$ ; 6 ml) をガラス反応セルに加え、高強度の超音波を照射した。反応条件は、強度設定が7であり、浴温度は22℃であり、反応時間は約30秒であった。前述のように、蛋白高分子殻内に含有された高濃度の狭いサイズ分布のフルオロクラウネーテルが合成された。実際、過フッ化炭化水素の充填された高分子殻を合成する実験法は、試験したすべての過フッ化炭化水素で同じであった。

### 実施例 3 7

#### 高分子殻内に捕捉されたパーフルオロ-*n*-ブチルブテン ( $C_{10}F_{18}H_2$ ) の合成

5% w/v の USP ヒト血清アルブミン (3.5 ml) と  $C_{10}F_{18}H_2$  (6 ml) をガラス反応セルに加え、高強度の超音波を照射できる。反応条件は、強度設定

(81)

特表平8-507075

は7、浴温度は22℃、反応時間は約30秒が典型的に使用できるであろう。この方法により、その中に捕捉された高濃度のフルオロ- $\alpha$ -ブチルブタンを含有する蛋白高分子殻が合成されるであろう。

### 実施例38

#### 高分子殻内に封じ込められた過フッ化炭化水素の毒性

5匹のラットにカテーテルを介して頸静脈から、20% v/vの過フッ化炭化水素懸濁物（HSA蛋白高分子殻に封じ込められたパーフルオロノナン）を10分間にわたって注入した。過フッ化炭化水素は、強いフッ素-炭素結合のため一般に非毒性である。確かに過フッ化炭化水素は、FDAの認可した人工血液代替物（フルオゾルDA）として問題なく使用されてきた。一定の時間にラットを採取して解剖した。ラットの一般的な健康を観察するばかりでなく、肝臓、脾臓、肺そして腎臓も注意深く調べた。0、5、2、8および24時間目に調べたラットはすべて健康であり、炎症を起こしている組織や臓器はなかった。5匹目のラットは、90日後も生存しており健康であった。比較のため、FDAに認可された大豆油のラットにおけるこの量はLD<sub>50</sub>量であり、これは過フッ化炭化水素が非毒性で安全であることをさらに示唆している。

### 実施例39

#### そのままの過フッ化炭化水素と高分子殻内に捕捉された過フッ化炭化水素の<sup>19</sup>F核磁気共鳴分光法

蛋白高分子殻内に封じ込められた過フッ化炭化水素と過フッ化炭化水素そのもののNMRスペクトルを、ブルカー（Bruker）500MHz NMR装置を用いて得た。その共鳴振動数である470.56 MHzで、装置を<sup>19</sup>Fに合わせた。ロッキングのために重水素溶媒を使用し、0 ppmでフレオン（CCl<sub>3</sub>F）をすべてのスペクトルの外部標準とした。パーフルオロノナンとCCl<sub>3</sub>Fを5 mmのNMRチューブに入れた。純粋なパーフルオロノナンのスペクトルは、2セットのシャープなピークがあり、1つは-87 ppmであり、他のセットは-127、-128、および-133 ppmのピークであった。

HSA蛋白高分子殻内に捕捉されたパーフルオロノナンの懸濁物をD<sub>2</sub>Oに再

(82)

特表平8-507075

懸濁し、同様のNMRスペクトルが得られた。20% v/vの過フッ化炭化水素懸濁物から強いシグナルが得られ、ピークすなわち共鳴は-81、-121、-122および-126 ppmにあった。超音波照射中に高分子殻内に過フッ化炭化水素を捕捉すると、パーフルオロノナンには化学的または構造上の変化はなかった。例えば、 $C_9F_{20}$ では、2つの別個の共鳴が観察された：1つは約-80 ppmで $CF_3$ に対応するもので、もう1つの共鳴は約-125 ppmで $CF_2$ に対応した。

#### 実施例 40

##### 局所温度を測定するための過フッ化炭化水素の $^{19}F$ 核磁気共鳴分光法

異なる温度のNMRスペクトルを、ブルカー（Bruker）500 MHz NMR装置を用いて得た。その共鳴振動数である470.56 MHzで、装置を $^{19}F$ に合わせた。ロッキングのために重水素溶媒（ $d_6$ -ジメチルスルホキシド [ $d_6$ -DMSO]）を使用し、0 ppmでフレオン（ $CCl_3F$ ）をすべてのスペクトルの外部標準とした。パーフルオロドデカン（融点77℃）と $d_6$ -DMSOを室温で5 mm NMRチューブに入れた。異なる温度でフッ素スペクトルを取り、線の幅を測定した。-81 ppmでの線の幅のデータは温度の関数として、以下のように示される：

<u>-81 ppmでの線の幅 (Hz)</u>	<u>温度 (℃)</u>
51.1	102
57.0	82
64.65	60

パーフルオロドデカンがその固体状態から液体状態へ転移するため、低温での広いスペクトルが温度の上昇とともにシャープになり始める。純粋な物質から予測されるように、この変化はシャープであり、突然である。

融点を広く低くするために、パーフルオロドデカンにペンタンを加えた（約2% v/v）。前述のように、パーフルオロドデカンが固体状態から液体状態へ転移するにつれて、低温での広いスペクトルがシャープになった。パーフルオロドデカン/ペンタン混合物の線の幅のデータは温度の関数として、以下のように示

(83)

特表平8-507075

される：

線の幅 (Hz)		温 度 (°C)
— 8 2 ppm	— 1 2 3. 3 ppm	
2 1. 2 6	8 7. 1 7	7 7
1 6 5. 8 9	2 8 0. 5 0	6 7
2 1 6. 6	3 4 1. 2	5 7
2 9 0. 7 7	4 3 6. 1 5	4 7
5 7 8. 2 7	4 5 1. 3 3	3 7
5 7 7. 6 2	5 2 5. 1 1	2 7

得られたパーフルオロドデカン／ペンタン混合物は、融点が低く予測されるように広い。この系では、27℃から77℃の範囲で温度測定ができる。与えられた線の幅で、局所温度を測定することができる。

インビボで局所温度を測定するためにこの方法を使用する例は、温度－線幅相関（これは経験的に決定される）を有する、融解転移の広い過フッ化炭化水素混合物（例えば、前述のもの）を含有する蛋白殻の注入である。このような処方は肝臓または脾臓に局在化し、 $^{19}\text{F}$ 造影剤として作用する以外に、同時に臓器内の種々の温度を局所的に決めるのに使用される（組織内の重大な異常の病状の解明を可能にする）。

#### 実施例 4.1

##### 模型（phantom）の $^{19}\text{F}$ 磁気共鳴画像

この模型実験に、高分子殻内に封じ込められた2つの型の捕捉過フッ化炭化水素を使用した。HSA蛋白高分子殻内に封じ込められたパーフルオロノナンとパーフルオロトリブチルアミンを、実施例33と34に記載したように合成した。合成した懸濁物は60容量%であり、これを生理食塩水で希釈し、2mlをポリスチレン製チューブに入れた。次にこのポリスチレン製チューブを、1.5テスラで運転している市販のジーメンス（Siemens）2T MRI装置（10cm  $^{19}\text{F}$ コイル）に入れた。エコー時間（TE）を10ミリ秒、そして繰り返し時間（TR）を300秒（256×256マトリックス）にして、5分間にわたってチュ



(84)

特表平8-507075

ープの $^{19}\text{F}$ 磁気共鳴画像を取った。

高分子殻内に封じ込められたパーフルオロノナン

<u>希 釈 率</u>	<u>〔濃度〕、M</u>	<u>画像の鮮明度</u>
1	1. 8	極めて良好
1 / 2	0. 9	極めて良好
1 / 4	0. 4 5	良好
1 / 1 0	0. 1 8	良好
1 / 5 0	0. 0 9	良好
1 / 1 0 0	0. 0 2	ぎりぎり

高分子殻内に捕捉された低濃度のパーフルオロノナンでも良好なMR模型画像が得られた。パーフルオロトリブチルアミンを封じ込めた高分子殻でも非常によく似たデータが得られた。高希釈倍率（1 / 1 0 0 ; 0. 0 2 M）でのみ、画像の品質と解像度は悪かった。

実施例 4 2

インビトロでの肝臓と脾臓の $^{19}\text{F}$ 磁気共鳴画像

300 gのラットに、HSA蛋白高分子殻懸濁物内に封じ込められた20% v / vのパーフルオロノナン2 mlを注入した。2時間目と5日目に、ラットを屠殺して、肝臓、脾臓、腎臓および肺を取り出した。次に例えば、全肝臓を、10 cm  $^{19}\text{F}$ コイルで運転している4テスラ MRI装置に入れた。TR = 1秒、TE = 20ミリ秒、そして256 × 128のデータマトリックス（すなわち、128の相コーディング工程、16のシグナルの平均）でT<sub>1</sub>加重シーケンスを用いて肝臓、脾臓および腎臓の $^{19}\text{F}$ 磁気共鳴画像を得た。

肝臓の $^{19}\text{F}$  MRI 画像は、高分子殻の肝臓摂取の程度に相関する異なる強度の領域を示していた。例えば、殻のほとんどは肝臓の網内系の細胞内に濃縮されるため、パーフルオロノナン含有高分子殻の存在が予測されない門脈に対応して、暗い領域が認められた。

注入の2時間後の肝臓スキャンの平均の像強度は、注入の5日後のスキャンより約20～30%高く、パーフルオロノナンの部分的崩壊（おそらく、高分子殻

(85)

特表平8-507075

の分解による)を示していた。全体として、肝臓の形態を示す極めて良好な画像が得られ、肝臓内の異常な病状の診断と位置推定におけるこの方法の可能性を示していた。

#### 実施例 4 3

##### 肝臓と脾臓のインビボ<sup>19</sup>F磁気共鳴画像

150gのラットに、HSA高分子殻内に封じ込められた20%v/vのパーフルオロノナン2mlを10分間にわたって注入した。次に全ラットを、10cm<sup>19</sup>Fコイルで運転している4テスラMRI装置に入れた。画像を取る前に、ラットをケタミンで麻酔した。TR=1秒、TE=20ミリ秒、そして256×128のデータマトリックス(すなわち、128の相コーディング工程、16のシグナルの平均)でT<sub>1</sub>加重シーケンスを用いて、ラット全体、および個々の臓器(例えば肝臓、脾臓および腎臓)の<sup>19</sup>F磁気共鳴画像を得た。

パーフルオロノナン含有HSA蛋白高分子殻の注入後、15分目、2時間目および24時間目に、ラットの画像を取った。全体として、肝臓と脾臓の形態を示す極めて良好な画像が得られ、肝臓網内系含有臓器内の異常な病状の診断と位置推定におけるこの方法の可能性を示していた。

#### 実施例 4 4

##### インビボ<sup>19</sup>F磁気共鳴画像法を用いる局所温度の測定

300gのラットに、HSA高分子殻内に封じ込められた20%v/vのパーフルオロドデカン/2%ペンタン(または、パーフルオロノナデカン酸および1%コレステロール)5mlを、10分間にわたって注入する。次にラットを、15cmコイル(ジーメンス(Siemens)1.5テスラMRI装置)に入れる。画像(256×256マトリックス)を取るために、10ミリ秒のTEと300秒のTRを使用する。データを取る前に、ラットをケタミンで麻酔する。5ミリメートルの厚さの切片を取って、肝臓と腎臓の画像を15分間にわたって取る。おとなしくなったラットを加熱パッドの中に入れて、室温と約37℃でデータを取る。

#### 実施例 4 5

##### <sup>19</sup>F磁気共鳴画像法を用いるインビボ酸素測定

(86)

特表平8-507075

300gのラットに、HSA高分子殻内に封じ込められた20%v/vのパーフルオロノナン5mlを、10分間にわたって注入する。次にラットを、15cmコイル（ジーメンス（Siemens）1.5テスラMRI装置）に入れる。画像（256×256マトリックス）を取るために、70ミリ秒のTEと3秒のTRを使用する。データを取る前に、ラットに拘束用具を取り付ける。酸素代謝を増加させるために、まずラットを酸素チャンバーに入れ、線幅と画像を取る。次にラットにケタミンを注入し、酸素消費を低下させ、再び線幅と画像を取る。ラット中の溶存酸素の量に対応して、画像の線幅と強度が変化するのが観察される。高い酸素濃度で最大の線幅が観察される。5ミリメートルの厚さの切片を取って、肝臓と脾臓の画像を15分間にわたって取る。麻酔したラットを加熱パッドの中に入れて、2つのデータ（1つは室温、もう1つは約37℃）でデータを取る。

#### 実施例46

##### タキソール粒子の調製

タキソールの結晶（シグマケミカル（Sigma Chemical））を10ミクロン未満のサイズの固体タキソールの粒子が得られるまで、ボールミルの中で摩砕した。粒子を等張生理食塩水に懸濁し、粒子カウンター（エルゾン（Elzone）、粒子データ）で計測して、粒子のサイズを測定した。粒子の100%が5ミクロン未満のサイズになるまで摩砕を続けた。静脈内送達に好適な粒子サイズは、5ミクロン未満であり、最も好適には1ミクロン未満である。

あるいは、水中のタキソールの懸濁物を、すべての粒子が10ミクロンより小さくなるまで超音波処理することにより、タキソールの粒子を得た。

10ミクロン未満のタキソール粒子はまた、濁った懸濁物が得られるまで水を加えて、エタノール中のタキソールの溶液からタキソールを沈殿させることにより得ることもできる。水の添加中に濁った懸濁物が得られるまで、随時タキソールの溶液を超音波処理してもよい。次に、得られる懸濁物を濾過し乾燥して、目的の範囲のサイズの純粋なタキソール粒子を得る。

揮発性溶媒（例えば、エタノール）中のタキソールの溶液を噴霧乾燥して、タキソールの微粒子を調製した。溶液を超音波ノズルに通すと、タキソールを含有

(87)

特表平8-507075

するエタノールの液滴が生成した。噴霧乾燥機中で得たのを蒸発させて、タキソールの微粒子が得られた。エタノール中のタキソールの濃度を変え、ノズルを通る液体の流速と超音波強度を調整することにより、粒子サイズを変えることができる。

#### 実施例 47

##### 多価アニオンに結合した常磁性陽イオンの合成

例えば、アルギン酸塩を  $GdCl_3$  の溶液に分散することにより、 $Gd$ -アルギン酸が合成できる。静脈内注入に適した  $Gd$ -アルギン酸の微小球粒子は、例えば  $Gd$  イオンを含有する溶液（例えば、 $GdCl_3$ ）に超音波照射して、少量の  $Na$ -アルギン酸を加えたことにより合成することができる。このアルギン酸塩を超音波照射により  $Gd$  イオンの溶液中に分散し、多価  $Gd$  イオンにより架橋することにより、ミクロンサイズの  $Gd$ -アルギン酸の粒子が産生される。超音波照射以外に、低速度または高速度混合を使用することもできる。

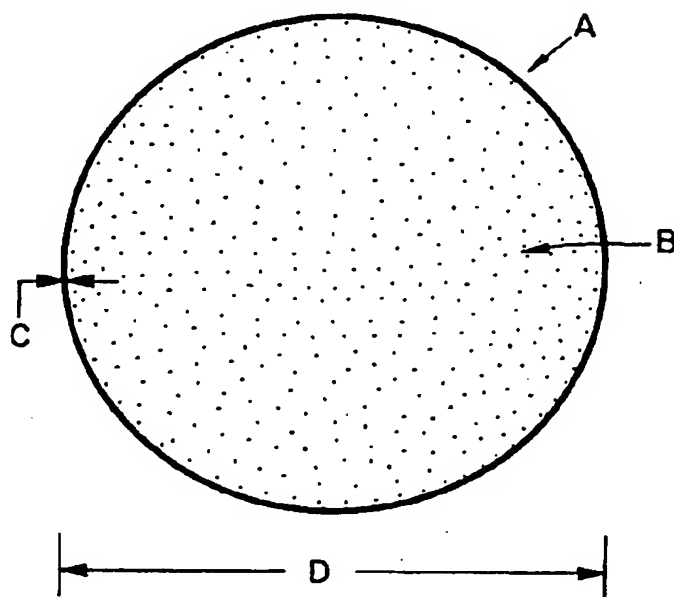
あるいは、 $Na$ -アルギン酸の溶液を、混ざり合わない有機溶媒または油（例えば、大豆油、ひまわり油、トルエン、メチレンクロリド、クロロホルムなど）に重層する。脂質に超音波を照射し（こうすると、アルギン酸含有水相が有機相に分散される）、次に多価イオンの溶液（例えば、 $GdCl_3$ 、 $MnCl_3$ 、 $FeCl_3$  など）を加える。こうして  $Na$ -アルギン酸は架橋され、静脈内注入後の MRI 造影剤としての使用に適した  $Gd$ -アルギン酸の小さな球形の粒子が得られる。アルギン酸塩や多価陽イオンを用いて基本的に任意の合成法を使用して、球、繊維、平板、ブロックなどを形成することができる。

本発明をいくつかの好適な実施態様に関して詳述したが、これらの修飾や変更も、請求の範囲に記載される本発明の精神と範囲内にあることは理解されるであろう。

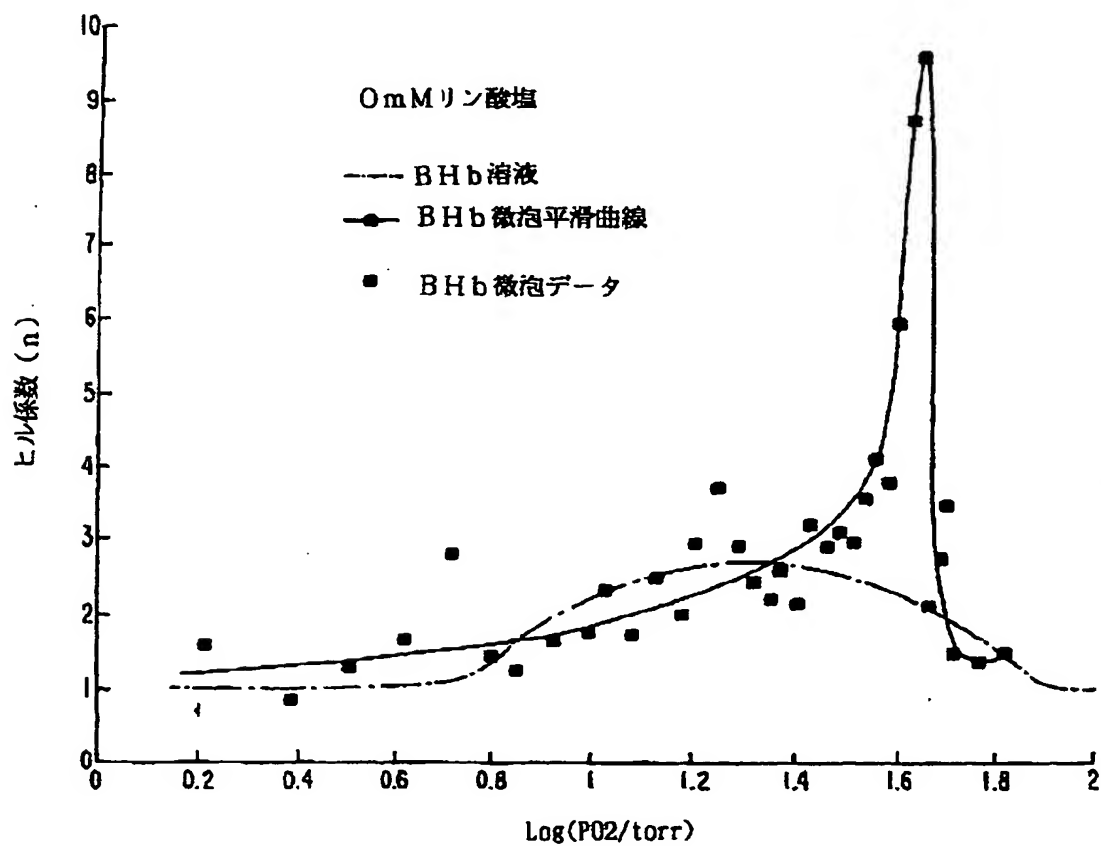
(88)

特表平8-507075

【図1】



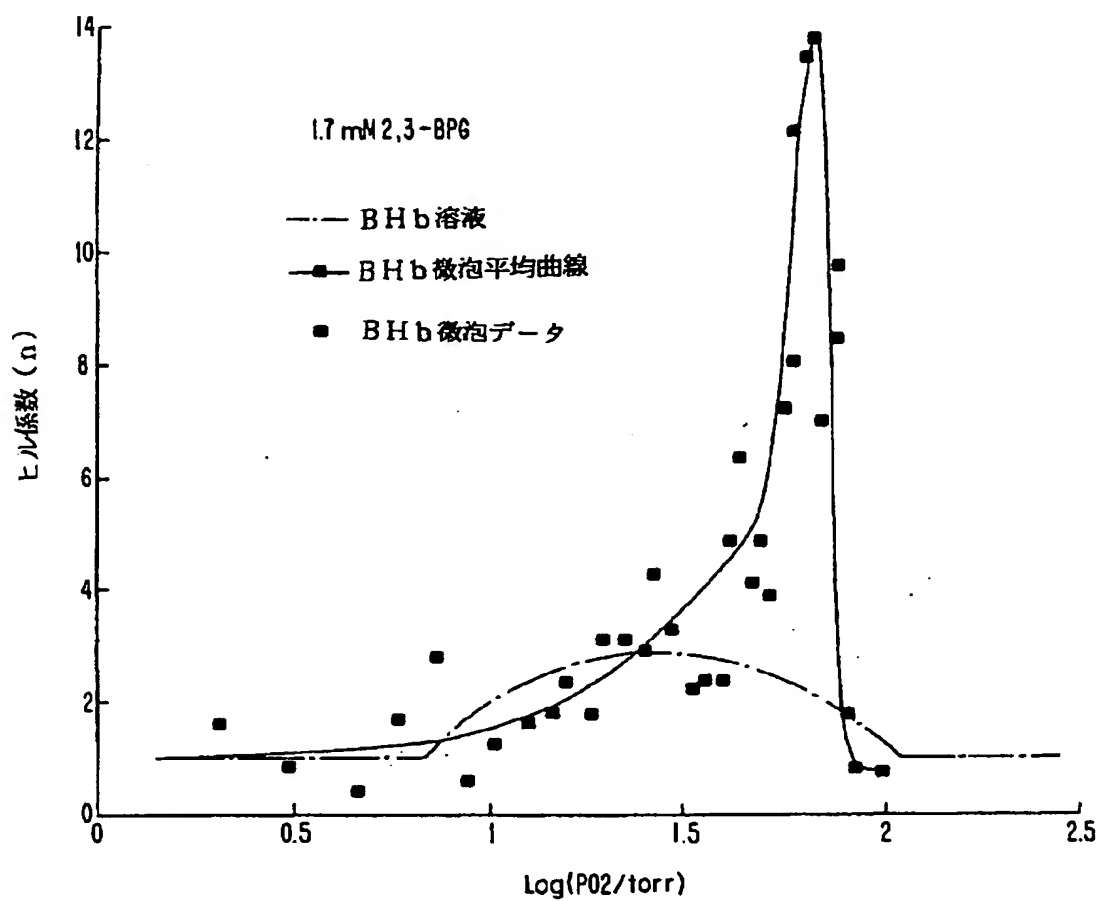
【図2】



(89)

特表平8-507075

【図3】



(90)

特表平8-507075

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. national application No. PCT/US94/01985
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(5) :A61K 9/48 US CL :424/451 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/451, 465, 450, 439 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US, A, 4,929,446 (BARTOLUCCI) 29 May 1990, see entire document.	1-35
A	US, A, 4,671,954 (GOLDBERG) 09 June 1987, see entire document.	1-35
A	US, A, 5,059,699 (KINGSTON) 22 October 1991, see entire document.	1-35
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 APRIL 1994		Date of mailing of the international search report MAY 16 1994
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Lenore Leavelle for</i> THURMAN K. PAGE Telephone No. (703) 308-2351

(91)

特表平8-507075

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I

A 61 K 51/00

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, ES, FI, G B, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, UZ, V N

(72)発明者 スーン - シオング, パトリック  
アメリカ合衆国90049 カリフォルニア州  
ロサンゼルス, チェノールト ストリート  
11755

(72)発明者 ウォング, マイクル  
アメリカ合衆国61820 イリノイ州シャン  
パーニュ, クレセント 601, ナンバー  
16

(72)発明者 サンドフォード, ポール, エイ.  
アメリカ合衆国90064 カリフォルニア州  
ロサンゼルス, オーバーランド アベニュー  
2822

(72)発明者 サスリック, ケニス, エス.  
アメリカ合衆国61821 イリノイ州シャン  
パーニュ, チェストナット コート 63

(72)発明者 デサイ, ニール, ビー.  
アメリカ合衆国90036 カリフォルニア州  
ロサンゼルス, アランデレ アベニュー  
847